UNIVERSIDAD DE LEÓN

**Respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR) a la
isquemia global tras 48 horas de reperfusión en el
cerebro de rata: El efecto de la edad y del meloxicam.**

*Unfolded protein response to global ischemia following 48 hours of
reperfusion in the rat brain: The effect of age and meloxicam*

Memoria que presenta

Taiana Cristina Burgin

para optar al grado de Doctor por la Universidad de León

Directores:

Dr. Arsenio Fernández López

Dra. Irene Lorenzo Llorente

León, 2014

Parte de los resultados que se presentan en esta memoria han dado lugar a la siguiente publicación:

Llorente IL, Burgin TC, Pérez-Rodríguez D, Martínez-Villayandre B, Pérez-García CC, Fernández-López A. 2013. Unfolded protein response to global ischemia following 48 h of reperfusion in the rat brain: the effect of age and meloxicam. *J Neurochem.* 127(5):701-710.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Arsenio Fernández López, que me haya permitido realizar la presente tesis doctoral en su grupo de investigación. Me gustaría darle las gracias, por la presencia, orientación y revisión constante al largo de la realización de este proyecto, allá en la distancia. También le agradezco por los buenos ejemplos que me hicieran madurar como alumna, en especial por la comprensión y paciencia en varios momentos.

También quiero agradecer a la Dra. Irene Lorenzo Llorente, por su gran ayuda a lo largo de toda la tesis y por haberme acompañado en el duro camino que hemos recorrido para llevar a cabo este trabajo, así como por los buenos momentos compartidos durante todos estos años.

En tercer lugar, quiero dar las gracias a mi tía, la Dra. Nádia Fátima dos Santos Bucco, por inscribirme en el Curso de Doctorado de la Universidad de León y por haberme presentado al grupo de investigación del Dr. Arsenio Fernández López, sin su ayuda, nada de esto habría ocurrido.

Quiero también agradecer a la Dra. Beatriz Martínez Villayandre su ayuda durante la realización de esta Tesis Doctoral y a la Dra. Sheyla Montori Pina, con la que comencé esta andadura en la investigación hace unos años y que me enseñó a dar mis primeros pasos en el laboratorio.

A todos las personas del área de Biología Celular donde he vivido gran parte de mi estancia en España. En especial a María Santos, le agradezco toda la ayuda e dedicación en la revisión de esta tesis. También agradezco a mis compañeros de

laboratorio Diego, Berta por toda la ayuda y dedicación en la realización de los experimentos y en la busca de solución en los problemas encontrados en la realización de este trabajo. A Marina (Oviedo), Cristina, Noelia, Cris, Sonia, Serafín, Sé, por los buenos momentos vividos en el departamento.

A Marta Fernández Caso y María Rehberger y, por su inestimable ayuda en el laboratorio siempre que las he necesitado.

Al equipo de Cirugía Veterinaria de la Universidad de León dirigido por el Dr. Manolo Gonzalo Orden y a su equipo de becarios y doctores, especialmente Marta, los cuales han ayudado en gran medida con el modelo experimental in vivo.

Al Dr. Christian Thode (Reino Unido) por haberme permitido realizar estancia en su laboratorio, que han enriquecido mis conocimientos para la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco especialmente a mi familia, que me apoya en cada etapa de mi vida. Este trabajo también es de ellos, pues estuvieron conmigo en todos los momentos, incluso en los más duros. Por ello doy las gracias a mi madre Nara Janete Fonseca dos Santos, a mi tía Nadége, abuela, hermanos Ricardo y Eduardo y a mis primos. ¡Muchas gracias!

No tengo palabras para agradecer toda la comprensión, paciencia, cariño y apoyo dedicado por mi esposo Marcos Moraes, que siempre estuvo a mi lado para llegar a este objetivo. Sin él, no tenía llegado hasta aquí.

A mi hermano Elvio y mi abuelo Pedro, que por desgracia ya no está a mi lado, aunque estoy segura de que me guarda desde donde esté.

A los amigos, que fueron muchos y estuvieran de una forma o de otra, presentes en esta etapa. En especial a los nuevos amigos, que hoy son más que amigos la pareja Priscila y Rodrigo Monteiro.

A una hermana española que tengo en mi corazón, Marta Flores Ordóñez, gracias por haber aparecido en mi vida, y por mantenerte siempre a mi lado.

A mi familia brasileña: Mirian, Virginia, Maiara, Armando, Fer (rubia), Fê, Carolina (Nina), Julio Zuse, Paulo, Gustavo, Nelson, Alessandra, Alexandre, Cíntia, Félix, Cris, Jacque.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera me han hecho más fácil este trabajo.

Muchas gracias!!!!

Índice

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	10
SUMMARY.....	12
INTRODUCCIÓN	15
El estrés de retículo	15
Principales marcadores en el estrés de retículo	17
La familia HSP (proteínas de choque térmico)	17
HSP70	18
GRP78/BIP.....	21
HSP90	22
GRP94	24
PDI (Protein Disulfide Isomerase)	25
CHOP	28
La activación de la UPR.....	29
La vía IRE1	30
La vía PERK	31
La vía ATF6.....	33
Degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD).....	34
Accidente cerebro vascular	36
Modelos animales de isquemia.....	40
Reperfusión	43
La isquemia cerebral y el estrés de retículo.....	44

La edad como factor de riesgo.....	46
Efecto de la edad en la UPR	47
Inflamación e isquemia	49
Tratamiento antiinflamatorio	51
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	54
MATERIALES Y METODOS.....	57
Animales.....	57
Isquemia global transitoria	57
Tratamiento antiinflamatorio	60
Obtención de muestras	60
Extracción de ARN y transcripción inversa (RT)	61
PCR en tiempo real.....	62
Ensayos de Western Blot.....	65
Análisis estadístico.....	66
RESULTADOS.....	69
Efecto de la edad y de la isquemia/reperfusión	69
PDI	71
GRP78/BIP.....	79
GRP94	86
Factor de transcripción proapoptótico: CHOP	91
DISCUSIÓN.....	97
Efecto de la edad	97
Efecto de la isquemia.....	100

El tratamiento con meloxicam.....	104
CONCLUSIONES	108
CONCLUSIONS	110
BIBLIOGRAFÍA	112

ABREVIATURAS

- **3MI/R:** Animales de 3 meses con 48 horas de perfusión tras la isquemia; 3-month-old animals following 48 hours of reperfusion after ischemia.
- **3MS:** Animales de 3 meses sacrificados 48 horas después de la cirugía pero sin sufrir isquemia. 3-month-old sham-operated animals.
- **18MI/R:** Animales de 18 meses con 48 horas de perfusión tras la isquemia; 18-month-old animals following 48 hours of reperfusion after ischemia.
- **18MS:** Animales de 18 meses sacrificados 48 horas después de la cirugía pero sin sufrir isquemia. 3-month-old sham-operated animals.
- **2VO:** Oclusión de dos vasos; two vessels occlusion
- **4VO:** Oclusión de cuatro vasos; four vessels occlusion
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico; deoxyribonucleic acid
- **ADNc:** ADN complementario; complementary DNA
- **AMPA:** Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
- **APAF:** Factor activador de proteasa apoptótica; apoptotic protease activating factor
- **ASK1:** Quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis; apoptosis signal-regulating kinase 1
- **ATP:** Trifosfato de adenosina; adenosine triphosphate
- **ATF4:** Factor 4 activador de la transcripción; activating transcription factor-4
- **ATF6:** Factor 6 activador de la transcripción; activating transcription factor-6
- **AVC:** Accidente cerebrovascular; cerebrovascular accident

- **CA1:** Región del hipocampo *cornu ammonis* 1; *cornu ammonis* 1 hippocampal region
- **CA3:** Región del hipocampo *cornu ammonis* 3; *cornu ammonis* 3 hippocampal region
- **CD11b (Mac-1):** Integrina alfa-M; integrin alpha-M
- **CHOP (C/EBP):** Proteína homóloga a C/EBP; C/EBP homologous protein
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2; cyclooxygenase 2
- **CREB, C/EBP:** proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP; cAMP response element binding protein
- **Ct:** Ciclo umbral; cycle threshold
- **CX:** Corteza cerebral; cerebral cortex
- **E1:** Enzima activadora de ubiquitina; ubiquitin activating enzyme
- **E2:** Enzima transportadora o conjugadora de ubiquitina; conveyor enzyme or ubiquitin-conjugating enzyme
- **E3:** Enzima ligasa de ubiquitina; ubiquitin ligase enzyme
- **EAAC1:** Transportador 1 de aminoácidos excitadores; excitatory aminoacid carrier 1
- **eIF2 α :** Subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción; eukaryotic translation initiation factor 2, α subunit
- **ERAD:** Degradación asociada al RE; ER-associated degradation
- **GABA:** Ácido γ -aminobutírico; γ -aminobutyric acid
- **GADD34:** Proteína 34 inducible por daño del ADN y detención de crecimiento; growth arrest and DNA damage-inducible protein 34

- **GAPDH:** Deshidrogenasa del gliceraldehído 3-fosfato; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- **GD:** Giro dentado; dentate gyrus
- **GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial; glial fibrillary acidic protein
- **GLAST:** Transportador de glutamato/aspartato; glutamate/aspartate transporter
- **GLT-1:** Transportador 1 de glutamato; glutamate transporter-1
- **GluR1:** Subunidad GluR1 del receptor de AMPA; AMPA receptor subunit GluR1
- **GluR2:** Subunidad GluR2 del receptor de AMPA, AMPA receptor subunit GluR2
- **GRPs:** Proteínas reguladas por glucosa; glucose related proteins
- **GRP78/BIP:** Proteína 78 relacionada con la glucosa/proteína de unión a inmunoglobulinas; glucose related protein 78/binding immunoglobulin protein
- **GRP94:** Proteína 94 relacionada con glucosa; glucose related protein 94
- **HERP:** Proteína del retículo endoplásmico inducida por homocisteína; Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein
- **HSF:** Factores de choque térmico. heat shock factor
- **HSP:** Proteína de choque térmico; heat shock protein
- **HSP70:** Proteína 70 de choque térmico; heat shock protein 70
- **HSP90:** Proteína 90 de choque térmico; heat shock protein 90
- **IL:** Interleucina; interleukin
- **iNOS:** Sintasa inducible del óxido nítrico; inducible nitric oxide synthase
- **I/R:** Isquemia/reperfusión; ischemia/reperfusion
- **IRE1:** Proteína-1 que requiere inositol; inositol-requiring protein-1
- **JNK:** Quinasa del dominio N-terminal de c-Jun; c-Jun N-terminal kinase

- **NBD:** Dominio de unión a nucleótidos, nucleotide binding domain
- **NFKB:** Factor nuclear κ B; Nuclear factor κ B
- **MAPK p38:** Quinasas de proteínas activadas por mitógenos p38/ p38 mitogen-activated kinases
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato; N-methyl-D-aspartate
- **NR1:** Subunidad NR1 del receptor NMDA; NMDA receptor subunit NR1
- **NR2A:** Subunidad NR2A del receptor NMDA; NMDA receptor subunit NR2A
- **NR2B:** Subunidad NR2B del receptor NMDA; NMDA receptor subunit NR2B
- **OGD:** Privación de oxígeno y glucosa; oxygen glucose deprivation
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud; World Health Organization
- **PDI:** Isomerasa de disulfuros de proteínas; protein disulfide isomerase
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa; polymerase chain reaction
- **PERK:** Quinasa del retículo endoplásmico de tipo de la quinasa de proteínas dependiente de ARN; protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
- **PP1C:** Subunidad catalítica de la fosfatasa 1 de proteínas, protein phosphatase 1 catalytic subunit
- **RE:** Retículo endoplásmico; endoplasmic reticulum
- **RNS:** Radicales de nitrógeno reactivos; reactive nitrogen species
- **ROS:** Radicales de oxígeno reactivos; reactive oxygen species
- **RT:** Transcripción inversa; reverse transcription
- **SBD:** Dominio de unión al sustrato; substrate binding domain
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

- **SNC:** Sistema nervioso central; central nervous system
- **S1P:** Proteasa de sitio 1; site-1 protease
- **S2P:** Proteasa de sitio 2; site-2 protease
- **TBS:** Tampón TRIS salino; TRIS buffer saline
- **TBS-T:** Tampón TRIS salino con Tween-20; TRIS buffered saline containing Tween-20
- **TRAF2:** Factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral; tumour necrosis factor receptor associated factor 2
- **TRAP1:** proteína 1 asociada al receptor de TNF; TNF receptor-associated protein 1
- **UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas; unfolded protein response
- **VGLUTs:** Transportadores de glutamato vesicular; vesicular glutamate transporters
- **XPB1:** Proteína 1 de unión a la secuencia X; X-box binding protein 1

RESUMEN

RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo multifuncional en el que se produce el plegamiento de proteínas, la biosíntesis de lípidos, y el almacenamiento de calcio. Las perturbaciones de energía, el agotamiento de los nutrientes, las alteraciones en la homeostasis del calcio y el estado redox alteran el normal funcionamiento del RE. Esta alteración también ocurre tras la falta de glucosa y oxígeno seguida de la vuelta a las condiciones normóxicas que ocurren en el ictus. El funcionamiento inapropiado del RE produce un plegamiento incorrecto de las proteínas que activa la vía de señalización denominada respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR, unfolded protein response). La activación de la UPR desencadena una importante respuesta transcripcional, que ajusta la capacidad de plegamiento de las proteínas en el RE según las necesidades de la célula. El objetivo de este estudio es analizar el papel de la edad en la respuesta a la isquemia cerebral y, adicionalmente el efecto producido por el agente antiinflamatorio meloxicam. El estudio se realizó en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, giro dentado y corteza cerebral en ratas de 3 y 18 meses de edad. Se utilizó un modelo de 15 minutos de isquemia cerebral global, seguido por 48 horas de reperusión. Para estimar la UPR se utilizaron una serie de marcadores representativos de la UPR incluyendo las chaperonas GRP78/BIP y GRP94, la isomerasa de disulfuros de proteínas (PDI) y el factor de transcripción CHOP, que se utiliza como marcador de muerte celular. Se cuantificaron los niveles de ARNm de PDI, CHOP, GRP78/BIP y GRP94 mediante PCR en tiempo real (qPCR) y los niveles de las proteínas PDI y GRP78/BIP mediante Western blot. El estudio muestra cómo los niveles de ARNm de estos genes fueron

similares en los animales de 3 meses y 18 meses de edad con operación simulada ("sham-operated"). Sin embargo, en el estudio de los animales sometidos a isquemia seguida de reperfusión (I/R), la edad juega un papel crucial, apreciándose un aumento notable en la expresión de los genes relacionados con la UPR en animales jóvenes, que es apenas apreciable en los animales viejos. El incremento en los niveles ARNm de estos genes en los animales de 3 meses de edad, fue suprimido e incluso revertido por el tratamiento el agente antiinflamatorio meloxicam. Los ensayos de Western blot mostraron que la UPR aún es detectable 48 h después de la isquemia en algunas de las áreas estudiadas, y proporcionan evidencia adicional de que la UPR es dependiente de la edad. El tratamiento con meloxicam provocó diferentes efectos sobre los niveles de PDI y GRP78/BIP entre la corteza cerebral y el hipocampo, en los estudios por Western blot. En este estudio se concluye que la respuesta de la UPR a la I/R es dependiente de la edad, es modificada por la inflamación y parece estar implicada en la vulnerabilidad isquémica. La UPR parece estar disminuida en animales viejos, lo que sugiere una disminución de la capacidad para la supervivencia celular.

SUMMARY

The endoplasmic reticulum (RE) is a multifunctional organelle where proteins are properly folded, lipids are biosynthesized and calcium is stored. Nutrient depletion, starvation, impairment in calcium homeostasis or redox state impair the normal RE function. This impairment also occurs after the oxygen and glucose deprivation followed by the return to normoxic conditions that happens in stroke. The malfunction in the RE leads to a protein misfolding which accumulate and activate the signaling pathway called the unfolded protein response (UPR). UPR activation triggers an extensive transcriptional response, which adjusts the folding capacity of the RE protein. This study aims to analyze the role of age in the UPR induced by cerebral ischemia, and the effect of the anti-inflammatory agent meloxicam. The study was carried out on the CA1 and CA3 hippocampal areas, dentate gyrus and cerebral cortex of 3 and 18 month-old rats, using a model of 15 minutes of global cerebral ischemia followed by 48 hours of reperfusion. Typical UPR markers were used, such as the molecular chaperones GRP78/BIP and GRP94, the protein disulfide isomerase (PDI) as well as the transcription factor CHOP, a widely used death marker. The expression of these genes was measured by quantifying PDI, CHOP, GRP78 and GRP94 mRNA levels by Real Time PCR (qPCR) and PDI and GRP78 levels by Western blot. The study shows how the mRNA levels of these genes were similar in 3 and 18 month-old sham-operated animals, while the ischemic insult elicited a noticeable increase in the expression of these genes in young animals that was scarcely appreciable in older animals. The striking increase in the mRNA levels of

these genes in 3 month-old animals was abolished or even reverted by the treatment with meloxicam. Western blot assays showed that the UPR is still detectable 48 hours after ischemia in some of the studied areas and provided evidence that the UPR is different between younger and older animals. Western blot assays carried out in young animals also showed that meloxicam elicited different effects on the levels of PDI and GRP78/BIP in the cerebral cortex and hippocampus. We conclude that the UPR response to ischemic/reperfusion insult is dependent on age and inflammation and could play an important role in ischemic vulnerability. The UPR appears to be strongly reduced in aged animals, suggesting a reduced ability for cell survival.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El estrés de retículo

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo implicado en la síntesis, plegado, transporte y maduración de proteínas (Dara *et al.*, 2011). En la luz del RE se acumulan las proteínas con destino al espacio extracelular o que formarán parte de muchos compartimentos celulares, tanto como proteínas de transmembrana como proteínas de la luz de dichos orgánulos. El microambiente oxidante del RE facilita el plegamiento apropiado de las proteínas, incluyendo su glucosilación y la formación de puentes disulfuro (Wu y Kaufman, 2006). Dado que la concentración de proteínas en el RE es muy alta, unos 100 mg/ml, se requiere un control de calidad muy estricto para asegurar el plegamiento correcto de las mismas. Si se producen proteínas mal plegadas, deben detectarse y actuar sobre ellas para que alcancen su conformación nativa. El plegamiento se realiza con ayuda de proteínas especializadas (chaperonas). Si las proteínas no pueden ser plegadas correctamente son eliminadas, normalmente mediante retrotranslocación y ubiquitinación (Kaufman, 2002).

La isquemia cerebral produce estrés oxidativo que da lugar a un incremento en la concentración de proteínas mal plegadas que se acumulan en la luz del RE. Esto activa varias vías de señalización intracelular que forman lo que se conoce como la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR, "Unfolded Protein Response") (Hayashi *et al.*, 2005; Paschen *et al.*, 2005; García *et al.*, 2004). La acumulación de estas

proteínas puede ser inducida por su glucosilación incorrecta al formarse o por un exceso en la actividad secretora celular (Shinkai *et al.*, 2010).

El calcio es otro agente que juega un papel importante en el estrés de retículo. El RE es el principal almacén de calcio intracelular y la función de las chaperonas del RE está estrechamente ligada a la concentración y modificación de sus niveles. Por ello, concentraciones anormalmente bajas de Ca^{2+} en el interior del RE pueden inducir acumulación de proteínas mal plegadas (Little, 1996; Paschen, 2005; Shinkai *et al.*, 2010).

La UPR se caracteriza por (1) la disminución de la traducción de ARNm en proteínas, (2) el aumento de la expresión de enzimas que promueven el plegamiento correcto de las proteínas, como las chaperonas y (3) la activación de un sistema de degradación de proteínas asociado al RE (ERAD, "Endoplasmic reticulum-associated degradation"). Estos tres mecanismos, en conjunto, reducen el riesgo de errores en el plegamiento de las proteínas (Kudo *et al.*, 2008). El propósito inicial de la UPR es disminuir el estrés de retículo, reduciendo la cantidad de proteínas mal plegadas y restablecer la función normal del RE. Si ocurre algún fallo en este proceso, el RE envía una señal que activa el principal factor de transcripción regulador de la inflamación, el factor nuclear κB (NF- κB) en las fases tempranas y lo inhibe en fases tardías (Kitamura, 2009). Cuando los mecanismos para el mantenimiento de la función normal de la célula no son suficientes para la eliminación de las proteínas mal plegadas, el estrés de retículo induce la activación de señales de muerte celular programada, la más estudiada de las cuales es la apoptosis (Xu *et al.*, 2005).

Principales marcadores en el estrés de retículo

La familia HSP (proteínas de choque térmico)

Las denominadas proteínas de choque térmico (HSPs, "Heat Shock Proteins"), son proteínas altamente conservadas durante la evolución y aparecen tanto en organismos procariotas como eucariotas (Johnson y Fleshner, 2006). El término HSP se originó tras el descubrimiento en 1962 (Ritossa *et al.*, 1962) de ciertos genes, en particular los que codifican un grupo de proteínas con un peso molecular de 70 kDa, que se sobreexpresan en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como respuesta a los aumentos de la temperatura ambiental. Los genes que codifican estas proteínas se localizan en los denominados "puffs" de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de *Drosophila*. El nombre "proteínas de choque térmico" fue introducido más tarde (Tissieres *et al.*, 1974) y se ha convertido en el término general para definirlas. Además de ser inducidas por el cambio de temperatura, la expresión de las HSPs se puede producir por diferentes tipos de estrés como privación de nutrientes, radiación, hipoxia, metales pesados, estrés oxidativo, infecciones o exposición a citoquinas inflamatorias (Mansilla *et al.*, 2012).

Las HSPs se clasifican en función de su peso molecular, e incluyen las familias Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y la familia de las pequeñas HSPs (Kim y Yenari, 2013). Muchas HSPs son chaperonas o moléculas asociadas a chaperonas que juegan una importante función en la respuesta al estrés y en la protección celular (Liu *et al.*, 2006). Las funciones principales de las HSPs son: (i) facilitar el plegamiento/replegamiento de proteínas para impedir la agregación de proteínas mal

plegadas, (ii) dirigir las proteínas mal plegadas hacia el proteasoma para su degradación y (iii) facilitar el transporte de la proteína mal plegada a través de la membrana (Udono, 2012).

Los estudios posteriores con privación de glucosa permitieron identificar nuevas proteínas de estrés, conocidas como proteínas reguladas por glucosa, (GRPs) (Santos, 2001). Las principales GRPs incluyen GRP78/BIP ("Glucose related protein 78/Binding immunoglobulin protein") y GRP94 ("Glucose related protein 94"), que codifican proteínas de pesos moleculares de 78 kDa y 94 kDa, con una sustancial homología en la secuencia de aminoácidos con HSP70 (Heat shock protein 70) y HSP90 (Heat shock protein 90), respectivamente. Las GRPs se localizan en el RE, donde hay una gran concentración intracelular de iones Ca^{2+} (Little *et al.*, 1996).

HSP70

La familia de las HSPs de 70 kDa es considerada la más conservada entre los diferentes tipos de HSPs, con más de un 50% de homología entre organismos tan diversos como seres humanos, *Drosophila*, ratón, levaduras y bacterias (Lindquist, 1986). Es también la más abundante y bien caracterizada, y está involucrada en el proceso general del plegado y en la prevención de agregados de proteínas (Sanders, 1993; Meyer y da Silva, 1999; Lacoste *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2010).

Figura 1: Modelo estructural del dominio HSP70, incluyendo el dominio de unión a nucleótidos NBD (azul), la región de enlace (linker en púrpura), los dominios de unión al sustrato SBD β (verde) y SBD α (rojo). (Imagen modificada de Qi *et al.*, 2013).

La proteína HSP70 se compone de un dominio ATPasa en la región N-terminal de 44 kDa (también llamado dominio de unión a nucleótidos, NBD) y un dominio de unión al sustrato (SBD) en la región C-terminal, que puede ser dividida en un subdominio (también llamado SBD- β) de 18 kDa que forma un bolsillo de unión hidrofóbico y un subdominio α (SBD- α) de 10 kDa localizado más próximo al extremo C que actúa como una tapa sobre el subdominio SBD- β (Gao *et al.*, 2012).

El sistema HSP70 y sus cochaperonas (HSP40 y factores de intercambio de nucleótidos) forman una de las familias de chaperonas moleculares más importantes, participando en funciones esenciales para el metabolismo proteico (Da Silva y Borges, 2011). Están involucradas en el plegamiento de proteínas ya que se unen a polipéptidos recién sintetizados, facilitan su plegamiento correcto, impiden la agregación de proteínas inducida por diferentes tipos de estrés y participan en la recuperación de proteínas mal plegadas (Wegele *et al.*, 2004). La expresión de

HSP70 también está regulada por factores de transcripción de choque térmico (HSFs), uno de los cuales, HSF1, es esencial para la transcripción de estos genes en células de mamíferos. El aumento de la expresión de HSP70 intracelular protege de la hipoxia, del exceso de radicales de oxígeno reactivos (ROS), endotoxinas bacterianas, infecciones y cambios de la temperatura (Tang *et al.*, 2007).

La familia HSP70 se compone de al menos ocho genes homólogos a HSP70 que difieren de acuerdo con su ubicación y función específicas en la célula (Tabla 1).

Proteína	Ubicación en la célula
Hsp70, Hsp701(A), Hsp72, Hsp70i	Citosol, núcleo, membranas
Hsc70, Hsp73	Citosol, núcleo, lisosomas
GRP78/BIP	Retículo endoplásmico
MtHsp70, Grp75	Mitocondria
Hsp70-6, Hsp70B	Citosol, núcleo
Hsp70t, Hsp70 Hom	Citosol
Hsp70-2, HSPA2	Citosol, núcleo

Tabla 1. Clasificación de los genes de la familia HSP70 de acuerdo con su localización en la célula. (Modificada de Daugaard *et al.*, 2005).

GRP78/BIP

La chaperona GRP78/BIP es una proteína de 78 KDa, que pertenece a la familia de las HSP70 con los característicos dominios NBD N-terminal y SBD C-terminal. La unión de GRP78/BIP al sustrato requiere gasto energético resultante de la actividad del dominio ATPasa (Schroder *et al.*, 2005).

La chaperona GRP78/BIP reside en el RE y tiene una doble función: la regulación del plegamiento de la proteína y la activación de la UPR en condiciones de estrés de retículo. En condiciones normales, GRP78/BIP se une e inhibe tres proteínas de membrana distintas, también conocidas como sensores de estrés: la quinasa PERK ("Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase"), la quinasa IRE1 ("Inositol-requiring protein-1") que también tiene actividad endonucleasa, y el factor de transcripción ATF6 ("Activating transcription factor-6") (Roller y Maddalo, 2013). En condiciones de estrés de RE, las tres proteínas se disocian de GRP78/BIP y se activan, lo que lleva a la transducción de señales de apoptosis o a la transcripción de los genes que codifican las chaperonas moleculares y las proteínas implicadas en la vía de degradación asociada al RE (Matsushita *et al.*, 2011).

La expresión de la chaperona GRP78/BIP es inducida como un mecanismo de protección del daño tisular cuando la función y homeostasis del RE está alterada por condiciones patológicas como estrés neurotóxico, infarto del miocardio o arteriosclerosis (Lee, 2007). Además, esta chaperona protege a las neuronas contra la excitotoxicidad y la apoptosis mediante la supresión del estrés oxidativo y la estabilización de la homeostasis del calcio. Por ello, GRP78/BIP y en general las

señales inducidas por estrés de RE representan nuevas dianas terapéuticas sobre las que actuar en las enfermedades neurodegenerativas (Li y Lee, 2006).

HSP90

Las HSP90 forman una de las familias más abundantes y conservadas de chaperonas, y juegan papeles esenciales en las células eucariotas. A diferencia de otras chaperonas como HSP70 y GroEL/ES, las chaperonas Hsp90 no son requeridas para el plegamiento *de novo* de la mayoría de las proteínas sino que facilitan la maduración final de un grupo específico de proteínas (Li *et al.*, 2012). En el retículo endoplásmico y en la mitocondria también se encuentran chaperonas homólogas a la HSP90, como GRP94 y TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1) (Sukla y Pitha, 2012). En el citoplasma, las HSP90s se dividen en dos subtipos: Hsp90 α y Hsp90 β . El subtipo Hsp90 α está formado por proteínas sensibles a la estimulación por calor, mientras que las proteínas del subtipo Hsp90 β responden a la inducción mitótica. El subtipo Hsp90 α contribuye principalmente al transporte y plegamiento de proteínas, y al mantenimiento de su conformación nativa para prevenir la agregación con el ATP. El subtipo Hsp90 β está relacionado con la señalización mediada por hormonas esteroides (Xu *et al.*, 2012).

Estructuralmente, HSP90 es un homodímero y cada subunidad contiene tres regiones flexibles enlazadas, un dominio N-terminal de unión a ATP (dominio N), un dominio medio (dominio M) y un dominio de dimerización C-terminal (dominio C) (Li *et al.*, 2012). Entre los dominios M y N aparece una región cargada que en ocasiones se denomina dominio de enlace ácido (Eletto *et al.*, 2010).

Figura 2: Modelo estructural de Hsp90. La proteína presenta tres dominios: dominio N-terminal de unión a ATP (N); un dominio medio (M), y un dominio de dimerización C-terminal (C) con una secuencia peptídica MEEVD. Existe una región cargada entre los dominios N y M que en ocasiones se denomina dominio de enlace ácido. Los tres dominios M, N y C interactúan con diferentes sustratos. (Imagen modificada de Xu *et al.*, 2012)

En general, las funciones de HSP90 son dependientes de la unión al ATP y de la hidrólisis de éste, y desempeñan un papel fundamental en el control de las múltiples señales asociadas con la viabilidad celular. Por otra parte, la sobreexpresión de HSP90 tiene una actividad patológica, ya que es un factor molecular clave que favorece el mantenimiento de la actividad cancerígena y las enfermedades neurodegenerativas (Morra *et al.*, 2012).

GRP94

GRP94 es una chaperona residente en el RE inducida por el estrés citosólico y de RE (Morito y Nagata, 2012). Su estructura ha sido determinada por cristalografía de rayos X y microscopía electrónica. Como todos los miembros de la familia HSP90, GRP94 comprende los dominios descritos anteriormente (Eletto *et al.*, 2010). En las regiones terminales N y C de GRP94 se pueden observar dos diferencias estructurales con la proteína HSP90 (Figura 3). La primera, es que los primeros 50 aminoácidos en la región N terminal de GRP94 son diferentes de los encontrados en la HSP90. Esto implica que la función de cambio conformacional citosólico realizado por los primeros 24 residuos de HSP90, incluida la participación en la dimerización de los dominios N-terminal después de ATP vinculante y cierre de la tapa probablemente son distintos en GRP94 (Marzec *et al.*, 2012).

Figura 3: Comparación de las características estructurales entre HSP90β y GRP94: Dominio N-terminal (azul), región cargada (amarillo) con el resto del dominio medio (púrpura) y el dominio de dimerización C-terminal (dímero, rojo). MEEVD, el péptido C-terminal de HSP90, que sirve como el objetivo para la unión de varias proteínas que contienen TPR. ATP, el sitio de unión de los nucleótidos. KDEL, el tetrapéptido C-terminal de GRP94 que sirve para la retención de proteínas lumenales en el RE. (Imagen modificada de Sreedhar *et al.*, 2004; Wegele *et al.*, 2004).

A diferencia de las proteínas HSP90 α y β , GRP94 no es inducida por temperaturas altas. Tanto GRP94 como GRP78/BIP son inducidos por estrés fisiológico del RE, por ejemplo durante la diferenciación celular (Wanderling *et al.*, 2007; Elleto *et al.*, 2010). El principal mecanismo de control de la expresión de GRP94 es la regulación transcripcional. La transcripción de GRP94 se inicia generalmente por la activación de las vías de transducción de señales que informan sobre los cambios fisiológicos y las condiciones en la luz del RE, es decir a través de la UPR (Elleto *et al.*, 2010).

La chaperona molecular GRP94 dirige el plegamiento y/o el montaje de las proteínas de membrana y de las proteínas secretadas como actividad más importante. Sin embargo, GRP94 es mucho más selectiva que otras chaperonas del RE, como GRP78/BIP o calreticulina. De hecho, existen muchas proteínas que no requieren la presencia de GRP94 para su plegamiento o tráfico hacia la superficie celular. Por ejemplo, muchos receptores de la membrana plasmática y proteínas secretadas como los receptores de transferrina y MHC proteínas de clase I. Esto se ha demostrado en células *knockout* y *knock-down* de GRP94 (Marzec *et al.*, 2012).

PDI (Protein Disulfide Isomerase)

La isomerasa de disulfuros de proteínas (PDI) es una enzima de 57 kDa muy abundante en todos los eucariotas, incluyendo levaduras, mamíferos y plantas (Kim *et al.*, 2012). La PDI pertenece a la familia de las oxidorreductasas y es una enzima residente en el retículo endoplásmico. La PDI actúa como una chaperona durante el

plegamiento de las proteínas y cataliza la rotura y formación de puentes disulfuro postraduccionalmente (Jasuja *et al.*, 2012).

Estructuralmente, PDI presenta cinco dominios dispuestos en la secuencia a – b – b' – a' – c como se muestra en la figura 4. Las zonas a y a' son dominios de tipo tiorredoxina (contienen dominios disulfuro con propiedades oxido-reductasa) cada una de ellos con sitios activos independientes (WCGHC). Las zonas b y b' no tienen propiedades oxido-reductoras pero presentan un plegamiento similar al de la tiorredoxina. El dominio b' parece estar relacionado con la interacción y reconocimiento de los péptidos por PDI (Ellgaard y Ruddock, 2005; Ferrari *et al.*, 1999; Gruber *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006; Rutkevich *et al.*, 2010). En la región terminal, las PDI presentan un dominio de transmembrana y una región ácida, que contiene el motivo KDEL, un péptido señal que utiliza la célula para retener a las proteínas en el retículo endoplásmico. Entre las zona b' y a' aparece una región corta llamada x-linker (Figura 4) (Imaoka, 2011; Kozlov *et al.*, 2010). Se cree que el dominio c es un sitio de unión del Ca^{2+} (Tian *et al.*, 2006). Los dominios b y b' son a menudo responsables de la selección del sustrato y al inhibir su agregación, son responsables de la actividad chaperona de la PDI (Ellgaard y Ruddock, 2005; Kozlov *et al.*, 2010). Entre las zonas a y b, aparece un dominio que presenta homología con el receptor de estrógenos, lo que sugiere que PDI puede funcionar como una proteína de unión a estrógenos. Se ha propuesto que PDI podría actuar como reservorio intracelular de estrógenos, y modelar las funciones biológicas de los estrógenos endógenos (Fu y Zhu, 2009; Imaoka, 2011).

Figura 4: PDI y sus principales reacciones: en la parte superior, organización de los cinco dominios de las proteínas PDI en mamíferos. Se muestra también la posición de la secuencia activa (WCGHC) en el dominio con homología con la tioredoxina. En la parte inferior se indican las principales reacciones redox catalizadas por PDI en los grupos tiol de las proteínas/péptidos (Pt) sustrato. En la reacción 3, la oxidación es producida por H_2O_2 , y se realiza especialmente en el compartimento de RE que es oxidante. (Imagen modificada de Stolf *et al.*, 2011).

En el RE, la PDI facilita el plegamiento de las proteínas sustrato actuando sobre sus grupos tiol para formar (oxidación) y romper (reducción) uniones disulfuro. Esto permite la isomerización de puentes disulfuro durante el plegamiento de las mismas, facilitando la formación de puentes disulfuro entre distintas cisteínas de la proteína y su estabilidad estructural. La PDI oxidada pasa a PDI reducida al catalizar la formación de puentes disulfuro (oxidación) en la proteína sustrato (Nakamura y Lipton, 2011).

CHOP

CHOP (C/EBP homologous protein) es una proteína de 29 kDa, con 169 residuos aminoacídicos en humano y 168 en roedores. La proteína CHOP presenta dos dominios funcionales: un dominio N-terminal de activación de la transcripción y un dominio C-terminal básico en tipo cremallera ("zipper") de leucina (bZIP) (Oyadomari y Mori, 2004). Además, CHOP contiene dos residuos de serina adyacentes (Ser79 y Ser82) que pueden ser fosforilados por la familia de quinasas de proteínas activadas por mitógenos p38 (p38 MAPK) (Maytin *et al.*, 2001; Oyadomari y Mori, 2004).

En condiciones normales CHOP está presente en el citosol, pero en condiciones de estrés celular se induce la expresión de CHOP y su acumulación en el núcleo (Ron y Habener, 1992; Oyadomari y Mori, 2004). El papel de CHOP en la apoptosis inducida por estrés de RE se ha puesto de manifiesto utilizando ratones *knock-out* en varias patologías, incluyendo disfunción renal, diabetes, daño en los hepatocitos inducido por etanol, enfermedad de Parkinson, colitis experimental o aterosclerosis avanzada. Sin embargo, los mecanismos moleculares aún no se comprenden bien (Tabas y Ron, 2011).

Uno de los mecanismos más estudiados en la apoptosis inducida por CHOP es la supresión de la proteína prosupervivencia Bcl-2. Inicialmente, se describieron correlaciones entre la expresión de CHOP, estrés oxidativo, apoptosis y "down-regulation" de Bcl-2 en una línea celular de fibroblastos de rata transfectadas con CHOP (McCullough *et al.*, 2001). Posteriormente se ha descrito el efecto de CHOP en

el control de la expresión de miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Tabas y Ron, 2011). Otros estudios han implicado a CHOP en el control de la expresión de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 como Bax (Fu *et al.*, 2010) o Bim (Puthalakath *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo juega un papel crucial en la inducción de la apoptosis mediada por CHOP. El estrés prolongado de RE lleva a un estado hiperoxidativo de la luz del RE, que da lugar a liberación de H_2O_2 en el citoplasma, e induce directamente la formación de ROS citotóxicos en el citoplasma. CHOP induce una oxidasa del RE llamada 1 α (ERO1 α) cuya sobreexpresión genera condiciones de hiperoxidación en el RE, contribuyendo a aumentar los niveles de proteína con plegado incorrecto y por tanto el estrés RE y la activación de la apoptosis (Hussain y Ramaiah, 2007; Lai *et al.*, 2007; Rasheva y Domingos, 2009).

La activación de la UPR

Las principales proteínas de transmembrana del RE involucradas en la activación de la UPR son: IRE1, PERK y ATF6. En condiciones fisiológicas, estas 3 proteínas están inhibidas por su asociación con GRP78/BIP (Ke *et al.*, 2011) que se ha descrito anteriormente. La chaperona GRP78/BIP es el principal sensor de la UPR (Chevalier *et al.*, 2000). Cuando las proteínas mal plegadas se asocian a GRP78/BIP, esta chaperona se disocia de la proteínas de transmembrana dejando de inhibir la UPR (Dara *et al.*, 2011).

Figura 5: Activación de la UPR. En el estado fisiológico normal, la chaperona del ER GRP78/BIP (una proteína de 78 kDa, regulada por glucosa) está unida a ATF6, PERK e IRE1, lo que da lugar a la supresión de la UPR. Cuando se produce una disfunción del ER, la presencia de proteínas mal plegadas hace que GRP78/BIP se disocie de ATF6 e IRE1 para aumentar la capacidad de plegado en la luz del retículo. La disociación de GRP78/BIP de PERK e IRE1 hace que éstos formen homodímeros, promoviendo su activación por autofosforilación y desencadenando la UPR. (Imagen modificada de Paschen y Mengesdorf, 2005).

La vía IRE1

IRE1 es una proteína de transmembrana del retículo endoplásmico, cuya región citosólica presenta un dominio quinasa y otro dominio endorribonucleasa. La región luminal de IRE1 se asocia con GRP78/BIP. Existen dos formas de IRE1 en las células de los mamíferos: IRE1 α que se expresa en muchos tipos celulares e IRE1 β que se expresa fundamentalmente en el epitelio del intestino. En respuesta al aumento de proteínas mal plegadas en el RE, GRP78/BIP se disocia de IRE1 y éste se dimeriza.

Esto hace que los dominios quinasa de la porción citosólica se autofosforilen, lo que a su vez activa su dominio endorribonucleasa localizado en su región C terminal (Ron y Walter, 2007). Este dominio activado se une a una región del ARNm que codifica el factor de transcripción XBP1 (X-box binding protein 1) y elimina una secuencia codificante de 26 aminoácidos situada en la región C terminal de XBP1. El XBP1 procesado es translocado al núcleo y se une a promotores de genes que codifican chaperonas y enzimas involucradas en el proceso de ERAD (Rasheva *et al.*, 2009). IRE1 también está involucrada en la degradación de ARNm codificantes de proteínas que serán translocadas a la luz del retículo. Esta respuesta complementa otras vías de la UPR ya que reduce la traducción global y consecuentemente la síntesis de proteínas (Scheunder y Kaufman, 2008). No obstante, los mecanismos pueden ser más complejos, si el estrés de retículo persiste, IRE1 puede interactuar con TRAF2 (Tumour necrosis factor-receptor associated factor 2), una proteína adaptadora que se acopla a ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1), dando lugar a la formación del complejo ternario IRE1-TRAF2-ASK1. Este complejo puede activar el factor de transcripción JNK (c-Jun N-terminal kinase). La vía IRE1/TRAF2 parece independiente de Xbp1 y puede desencadenar apoptosis (Rasheva *et al.*, 2009).

La vía PERK

PERK es una proteína de transmembrana del RE con un dominio quinasa de serinas/treoninas que también es activado como consecuencia de la acumulación de proteínas mal plegadas del RE y desencadena la UPR. La presencia de proteínas mal plegadas, hace que PERK se disocie de GRP78/BIP y se dimerice, lo que induce la

activación de su dominio quinasa con la consiguiente autofosforilación. Este dominio fosforila la Ser51 del factor de iniciación eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α subunit) (Malhi y Kaufmann, 2011).

La traducción de proteínas en el ribosoma requiere proteínas conocidas como factores de iniciación eucarióticos (eIFs). Cuando eIF2 α es fosforilado se produce una disminución de la traducción de la mayoría de los ARNm. Esta atenuación reduce la sobrecarga de péptidos en el RE y alivia el estrés de retículo (Harding *et al.*, 1999). La reducción de la traducción global mediante la fosforilación de la subunidad eIF2 α en el residuo Ser51 aparece en diferentes tipos de estrés celular como la hipoxia, infección viral, falta de aminoácidos, choque térmico y estrés del RE (Holcik y Sonenber, 2005).

Existen algunas excepciones, así, algunas proteínas, como ATF4 (activating transcription factor 4) que pertenece a la familia CREB (cMAP response-element binding) de factores de transcripción, requieren la fosforilación de eIF2 α para su traducción. ATF4 es esencial para inducir la transcripción de la molécula GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34), una proteína citosólica, que se asocia a la fosfatasa de proteínas (PP1C) para desfosforilar eIF2 α , lo que permite de nuevo la síntesis proteica algunas horas después del estrés. Este circuito regulador protege a la célula contra periodos prolongados de falta de síntesis de proteínas (Boyce y Yuan, 2006; Ron y Walter, 2007).

ATF4 también induce la síntesis de CHOP, que como hemos señalado es un factor de transcripción que induce la apoptosis en las células expuestas a estrés

crónico de RE. Por tanto, ATF4 actúa restableciendo el inicio de la síntesis proteica mediante desfosforilación de eIF2 α , lo que puede dar lugar a apoptosis vía CHOP si el reinicio de la síntesis proteica mantiene el estrés del retículo. Por lo tanto, la señalización mediada por PERK tiene diversas finalidades, permitiendo a la UPR modular varios aspectos del metabolismo celular, homeostasis del RE e incluso supervivencia o muerte celular (Gass *et al.*, 2004).

La vía ATF6

La vía ATF6 sigue un proceso diferente de las dos vías descritas anteriormente. ATF6 es una proteína de transmembrana del RE, que de modo análogo a los sensores indicados anteriormente está asociado a GRP78/BIP del cual se disocia cuando hay una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. El ATF6 liberado migra al aparato de Golgi, en el cual es plegado y escindido de forma sucesiva por proteasas residentes (S1P y S2P). Estas proteasas escinden el dominio luminal de ATF6 y a continuación el dominio citosólico (N-terminal) el cual es liberado al citosol. Esta región liberada es un factor de transcripción que viaja al núcleo y activa genes diana de la UPR. Entre estos genes destacan los que codifican la chaperonas GRP78/BIP y GRP94 así como la PDI. No se conoce bien el proceso de actuación de ATF6. Parece que tiene en su dominio luminal puentes disulfuro que actúan como sensores redox (Ron y Walter, 2007). El plegamiento proteolítico de ATF6 induce directamente la activación transcripcional del gen XBP1 y de chaperonas (Seo *et al.*, 2008).

La respuesta adaptativa de la UPR ofrece protección frente a la muerte celular, sin embargo, cuando la activación de la vía de la UPR es excesiva, el estrés del RE dispara el proceso de muerte celular. Aunque el mecanismo es poco conocido, se ha descrito que la apoptosis inducida por estrés del RE implica diferentes mecanismos, incluyendo la activación de caspasas (12 y 4), quinasas (JNK) y factores de transcripción mediadores de la apoptosis (CHOP) (Oyadomari y Mori, 2004). CHOP puede ser inducida por ATF6 y XBP1, pero la vía PERK-eIF2 α es dominante (Scull y Tabas, 2011).

Degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD)

Una de las actividades presentes en el control de la calidad de las proteínas en el RE y que está relacionada con el correcto plegamiento de las mismas es el fenómeno conocido como ERAD (Romisch, 2006). La ERAD, además de su papel en los procesos de control de calidad de las proteínas en condiciones normales, juega un papel básico de la respuesta celular al estrés. Este mecanismo degrada las proteínas mal plegadas o dañadas de forma irreversible, a través del sistema ubiquitina-proteasoma. Las proteínas mal plegadas se reconocen en el RE y son transportadas de forma retrógrada hacia el citosol a través del complejo Sec61 ubicado en la membrana del RE (Sitia y Braakman, 2003). Uno de los pasos cruciales en la ERAD es la poli-ubiquitinación de las proteínas que van a ser degradadas mediante una serie de reacciones enzimáticas consecutivas catalizadas por varias serie de enzimas que actúan sucesivamente: enzima activadora de ubiquitina (E1),

que activa la ubiquitina, la cual se asocia a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que permite la transferencia de la ubiquitina a la proteína a degradar. Este último proceso es catalizado por la ligasa de ubiquitinas (E3) (Layfield *et al.*, 2001). En la ERAD, las ligasas de ubiquitina pertenecen a la familia Hrd que están situadas en la membrana del RE y son inducidas por el estrés de retículo (Kaneko y Nomura, 2003; Vembar y Brodsky, 2008).

Accidente cerebro vascular

El accidente cerebral vascular (AVC), también llamado ictus, es una de las principales causas de muerte en los países industrializados (Cao *et al.*, 2011). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 15 millones de personas al año —es decir, una de cada 400 personas— sufren algún tipo de accidente cerebrovascular. Las personas con más de 65 años son las más afectadas, pero el accidente cerebral vascular puede ocurrir a cualquier edad, incluso en niños (Allen y Bayraktutan, 2009). En España, la isquemia cerebral es la primera causa de muerte entre mujeres (Instituto Nacional de Estadística, últimos datos correspondientes a 2011) y la principal causa de incapacidad permanente en ancianos (Castilla-Guerra *et al.*, 2007). Tres meses después de un accidente vascular cerebral, el 15-30% de los supervivientes presentan incapacidad permanente y el 20% necesitan cuidados institucionales. Entre los diferentes tipos de incapacidad se incluyen: parálisis parcial, y déficits de memoria, pensamiento y/o lenguaje (Lakhan *et al.*, 2009).

Existen 2 tipos de accidente cerebrovascular: isquémico y hemorrágico. El primero de ellos es el más frecuente con un porcentaje estimado de un 85 % de los ictus. Este tipo de daño cerebral se produce cuando un trombo bloquea el aporte de sangre al sistema nervioso central (SNC), dando lugar a una isquemia cerebral y el consecuente daño neural y muerte celular. El segundo tipo de accidente cerebral, denominado ictus hemorrágico, representa aproximadamente el 15 % de los casos y

se debe a una ruptura de algún vaso sanguíneo. La hemorragia debida a esta ruptura produce un rápido daño cerebral (Gupta y Chauhan, 2011).

Figura 6. Accidente cerebrovascular. A la izquierda se muestra un ictus de tipo isquémico y a la derecha un ictus de tipo hemorrágico. ICH: hemorragia intracerebral, SAH: hemorragia subaracnoidea. (Imagen modificada de Rink y Khanna, 2011).

Los principales mecanismos involucrados en la muerte neuronal tras la interrupción del flujo sanguíneo incluyen el fallo energético, excitotoxicidad, acumulación de ROS, señalización apoptótica, y un proceso inflamatorio (Lo *et al.*, 2003). El fallo energético se debe a la depleción del ATP (trifosfato de adenosina) y altera en primer lugar la ATPasa de Na^+/K^+ . La inactividad de esta bomba iónica altera el gradiente iónico de las membranas ya que aumenta la concentración extracelular de K^+ y la entrada de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Moro *et al.*, 2005).

La entrada de iones de Na^+ en la célula provoca la acumulación de agua dentro de la célula e induce edema (Zemke *et al.*, 2004). Una de las consecuencias del aumento de Ca^{2+} en la célula es la liberación excesiva de glutamato, el cual ejerce un papel esencial en la patogénesis de la lesión cerebral isquémica, denominada excitotoxicidad (Culmsee y Krieglstein, 2005). La excitotoxicidad induce una gran acumulación de calcio intracelular que lleva a una sobrecarga mitocondrial, inhibición de la producción del ATP y alteración de los fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos por la activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+} (Moro *et al.*, 2005). El estrés oxidativo, el fallo energético y la pérdida de la homeostasis celular del calcio, llevan a cambios en la permeabilidad mitocondrial iónica y a la disfunción mitocondrial como se muestra en la figura 2 (Culmsee y Krieglstein, 2005; Moro *et al.*, 2005; Onteniente *et al.*, 2003). Esto hace que moléculas mitocondriales, como el citocromo c, endonucleasa G, AIF, Smac/DIABLO, entre otras, se liberen al citosol, contribuyendo a los mecanismos de muerte celular retrazada tales como apoptosis y muerte celular independiente de caspasas. En particular, el citocromo c forma parte del apoptosoma junto con caspasa 9 y APAF (Apoptotic protease activating factor) (Zemke *et al.*, 2004). La falta de equilibrio iónica durante la isquemia cerebral genera ROS y radicales de nitrógeno reactivos (RNS) que pueden llegar a destruir orgánulos y la membrana plasmática, contribuyendo a la disfunción de la barrera hematoencefálica y al edema tisular.

Figura 7. Mecanismos implicados en la muerte neuronal tras la isquemia. La pérdida de energía conduce a la disfunción mitocondrial y a la generación de radicales de oxígeno reactivos (ROS) y radicales de nitrógeno reactivos (RNS). Además, el déficit de energía conduce a un desequilibrio iónico, salida de glutamato, excitotoxicidad y acumulación de calcio intracelular. Esto lleva a la producción de radicales libres y a la activación de proteasas dependientes de calcio y cascadas de caspasas que conduce en conjunto a la degradación de lípidos de membrana, proteínas celulares y ADN. (Imagen modificada de Lo *et al.*, 2003).

El daño isquémico induce una importante respuesta inflamatoria, donde mediadores como citoquinas o moléculas de adhesión son liberados o activados, estimulando la infiltración de leucocitos en el parénquima del encéfalo (Moro *et al.*, 2005).

Modelos animales de isquemia

En el estudio de los procesos celulares implicados en el estrés de retículo, resultante de un proceso isquémico se utilizan diferentes modelos experimentales para poder identificar los mecanismos moleculares implicados y evaluar posibles sustancias neuroprotectoras.

Los modelos pueden ser: isquemia global cuando afectan a todo el cerebro, o isquemia focal cuando afectan a una pequeña región. Además, la isquemia puede ser transitoria o permanente dependiendo de que exista o no reperusión tras la misma.

Los modelos experimentales de isquemia cerebral global bloquean las arterias que llevan la sangre al encéfalo, simulando los trastornos circulatorios globales que ocurren durante un ataque cardíaco, hipotensión grave, ahogamiento, etc. (Schmidt-Kastner y Freund, 1991). Existen varios modelos experimentales, el modelo de oclusión de 4 vasos (4VO) que incluye la cauterización de las arterias vertebrales y la oclusión temporal de las arterias carótidas comunes (Netto *et al.*, 1993; Valentim *et al.*, 1999). En el modelo de oclusión de 2 vasos (2VO) únicamente se bloquean las dos arterias carótidas comunes, pero es preciso utilizar una hipotensión sistémica (por debajo de 50 mm de Hg) para impedir el riego desde la arterias vertebrales a través del polígono de Willis. Esta hipotensión puede producirse farmacológicamente o mediante exanguinación controlada del animal. El modelo 2VO se desarrolló por primera vez en la década de los 70 (Eklöf y Siesjö, 1972) y utiliza la reducción parcial del flujo sanguíneo, lo que es suficiente para causar daño cerebral, principalmente en

las neuronas piramidales del área hipocampal CA1, y también aunque en menor medida en corteza cerebral (CX) y caudado-putamen (Smith et al., 1984).

Los modelos experimentales de isquemia cerebral focal se basan en la oclusión de alguna arteria cerebral de modo que la interrupción del flujo sanguíneo solamente afecta a una pequeña parte del cerebro. El modelo más utilizado es la oclusión de la arteria cerebral medial y reproduce uno de los tipos de ictus más frecuentes en la patología humana (Prieto-Arribas et al., 2008).

Los modelos de privación de oxígeno y glucosa (OGD, Oxygen Glucose Deprivation) se han diseñado para simular en cultivos celulares y ensayos *ex vivo* los fenómenos que ocurren en la isquemia *in vivo*. En estos modelos se elimina la glucosa y el oxígeno del medio para reproducir las carencias que ocurren en la isquemia (Cárdenas *et al.*, 2000; Cimarosti *et al.*, 2001). La principal ventaja de este modelo es que permite un control muy estricto del microambiente extracelular, se pueden controlar los tiempos de OGD, añadir concentraciones precisas de fármacos, y cuando se utilizan secciones cerebrales, mantener las características histológicas y electrofisiológicas del tejido cerebral.

Este modelo abre numerosas posibilidades de estudio incluyendo la posibilidad de expresar genes recombinantes. La vuelta a condiciones normóxicas se considera el equivalente a la reperusión y de hecho se suele denominar "reperfusion-like" si bien tiene algunas diferencias, entre otras, los niveles de concentración que se alcanzan por las sustancias liberadas durante la OGD, como glutamato, GABA o productos derivados de la necrosis celular.

Una variante en el uso de la OGD es la utilización de cultivos organotípicos de secciones hipocampales (Pringle *et al.*, 1999; Cimarosti *et al.*, 2001; Valentim *et al.*, 2003). Una de las principales características de los cultivos organotípicos es que mantiene bastante conservada la organización celular del tejido vivo (Horn *et al.*, 2005; Striggow *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2001).

El modelo *ex vivo* de secciones cerebrales comenzó a utilizarse en la década de los 80 (Whittingham *et al.*, 1984). Se realizan secciones de tejido cerebral (350-400 µm de grosor) que tras dejarlas estabilizar aproximadamente una hora son sometidas a privación de oxígeno y glucosa (Kass y Lipton, 1982; Lobner y Lipton, 1993; Reith *et al.*, 1989; Schurr *et al.*, 1988). Una de las ventajas del uso de secciones cerebrales es que se elimina la barrera hematoencefálica lo que facilita el uso de fármacos inhibidores o potenciadores de la UPR. El problema principal es que la ventana de trabajo es solo de unas horas (Dos-Anjos *et al.*, 2008).

Cada modelo experimental en el estudio del daño celular inducido por la isquemia tiene ventajas e inconvenientes. Los modelos *in vivo* reproducen mejor lo que ocurre en los ictus en humanos, pero son mucho más difíciles de analizar dado que intervienen muchos parámetros y hay que considerar factores muy diversos como la respuesta inflamatoria, tiempos de reperusión o edad y sexo del animal. En los modelos *ex vivo* o de cultivos los parámetros son mucho más fáciles de controlar pero el modelo es menos parecido a lo que ocurre en humanos.

Reperusión

La reperusión se define como la restauración del flujo sanguíneo después de la isquemia, pero induce un daño en el tejido neural que se denomina "lesión por reperusión" (Aronowski *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2003). El restablecimiento de los niveles de oxígeno y glucosa en las células permite que se recupere la fosforilación oxidativa, pero puede disparar una serie de reacciones bioquímicas que afectan la recuperación de las mitocondrias y actúan como fenómenos perjudiciales para la célula, llegando a producir la muerte neuronal (White *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2003), como se muestra en la figura 8. Esta figura muestra diferentes vías activadas por la isquemia y la reperusión. Algunos de los efectos dañinos son comunes, como la activación de los radicales libres (O'Rourke, 2003) y la activación de la apoptosis en las células que no pueden superar la señalización de muerte (Crompton, 2000).

Posiblemente la causa de la lesión por reperusión es el desequilibrio en la homeostasis de iones, principalmente en la distribución del calcio y el proceso de peroxidación (Folbergrová, 1993).

Figura 8. Procesos que llevan a la muerte celular por isquemia y reperusión. (Imagen tomada de White *et al.*, 2000).

La isquemia cerebral y el estrés de retículo

La isquemia cerebral global y la posterior reperusión llevan a la inhibición de la síntesis de proteínas, que es reversible en la mayoría de regiones del cerebro, pero persiste selectivamente en las regiones vulnerables del mismo (Krause y Tiffany, 1993; Kumar *et al.*, 2003).

El fallo energético resultante de la disminución de la concentración de oxígeno y glucosa durante la isquemia impide que la ATPasa dependiente de Ca^{2+} pueda

mantener las concentraciones bajas de Ca^{2+} características de la célula (Doyle *et al.*, 2008). El espacio extracelular y el interior del retículo endoplásmico mantienen concentraciones de Ca^{2+} elevadas, superiores a 1 mM, aunque la concentración libre de este ión en el RE varía de 50 a 500 μM . En el citoplasma la concentración de Ca^{2+} es de aproximadamente 100 nM. El almacenamiento de Ca^{2+} juega un papel crucial en la señalización celular y la sobrecarga y depleción del Ca^{2+} en el retículo tienen una enorme relevancia en el daño celular (Coe y Michalak, 2009). La calreticulina es una chaperona del RE que actúa como tampón de Ca^{2+} y puede acumular más del 50% del Ca^{2+} del RE pero otras chaperonas como GRP78/BIP, GRP94 o PDI también modulan la cantidad de calcio en el RE (Coe y Michalak, 2009). Las fluctuaciones en el calcio en la luz de retículo modifican la actividad de estas proteínas. De hecho, la calreticulina en condiciones de calcio muy bajas (<100 μM) es degradada rápidamente por la tripsina mientras que a concentraciones mayores de 500 μM el dominio N-terminal de la calreticulina es resistente a las proteasas (Corbett *et al.*, 2000). La interrupción de la homeostasis del calcio en la célula es el efecto más adverso e inmediato causado por el estrés de RE, y produce la acumulación crónica de proteínas mal plegadas (Hetz y Soto, 2006). El efecto es muy perjudicial para las neuronas, debido al papel importante de los cambios en los niveles de calcio en la actividad neuronal. Por esta razón, el mantenimiento de una concentración específica de Ca^{2+} en el citoplasma es crítico para el funcionamiento neuronal normal (Mukherjee y Soto, 2011)

La alta concentración de calcio en la luz del retículo, en comparación con la del citoplasma (Pozzo-Miller *et al.*, 1997) es importante no sólo para la señalización

mediante calcio, sino también en el plegado y procesamiento de las proteínas recién sintetizadas, ya que las reacciones del sistema de control de calidad de las proteínas son dependientes de calcio y requieran una alta concentración del mismo, para su correcto funcionamiento (Lodish *et al.*, 1992). Cuando el plegamiento de proteínas y reacciones de procesamiento están afectados, se acumulan en el retículo y se activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Paschen, 2005) como se ha indicado previamente.

La edad como factor de riesgo

La identificación y tratamiento efectivo de los principales factores de riesgo de accidente cerebrovascular representa un importante papel en su prevención. Los factores de riesgo para AVC isquémico son múltiples y actúan de forma combinada, reflejando la heterogeneidad de la enfermedad. Algunos de ellos son inevitables: edad, un AVC previo, un ataque isquémico transitorio (ATI), diabetes, aterosclerosis, fibrilación arterial, trombofilia. Otros pueden ser evitables y su prevención reduce el riesgo de sufrir un AVC. Entre ellos se pueden señalar: hipertensión, colesterol elevado, tabaquismo y estrés. Los factores de riesgo evitables e inevitables a menudo coexisten y afectan al 60-80% de la población (Jablonska y Lukomska, 2011).

La edad es el factor de riesgo más importante en el accidente cerebrovascular (Ay *et al.*, 2005; Baltan *et al.*, 2008; Barnett, 2002; Broderick, 2004; Schaller, 2007; Seshadri *et al.*, 2006), ya que aumenta la prevalencia del ictus (Barnett, 2002; Muntner *et al.*, 2002; Sutherland *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2003; Vellai, 2009). Esto

hace que el ictus sea una de las principales causas de muerte e invalidez en ancianos (Davis *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 2003; Taoufik y Probert, 2008). En España, los datos del INI muestran que la incidencia del ictus aumenta exponencialmente a partir de los 65 años, con una predominancia en varones.

Los diferentes estudios que han dado lugar a neuroprotección en los modelos animales, no han dado buenos resultados en los ensayos clínicos (Petcu *et al.*, 2008). Una posible explicación para esta discrepancia es que la mayoría de los estudios se realizan en individuos jóvenes (Davis *et al.*, 1995) los cuales no proporcionan un buen modelo de los efectos del ictus en el tejido neural de los individuos de edad avanzada (Brown *et al.*, 2003; Markus *et al.*, 2005; Popa-Wagner *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995), ya que la respuesta a la isquemia es diferente en los adultos jóvenes y en los adultos de edad avanzada (Ay *et al.*, 2005, Montori *et al.*, 2010 a, b, c; Montori *et al.*, 2012). Comprender la diferente respuesta debida a la edad en la patofisiología de la isquemia cerebral es un proceso clave y debe de ser tomada en cuenta en el tratamiento de la misma (Baltan *et al.*, 2008).

Efecto de la edad en la UPR

El envejecimiento es un proceso multifactorial que afecta las funciones fisiológicas y bioquímicas en la mayoría de los órganos, aumentando la susceptibilidad a diversas enfermedades asociadas con la edad (Rodríguez-Rodero *et al.*, 2011). El proceso de envejecimiento implica varios cambios estructurales y funcionales en el cerebro humano (Hof y Morrison, 2004; Esiri, 2007; Yankner *et al.*, 2008). Todavía se discute si los cambios relacionados con la edad en el cerebro

reflejan enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, o bien al propio proceso de envejecimiento. En la actualidad parece haber un acuerdo en la idea de que el envejecimiento puede inducir cambios en el cerebro que no están vinculados a ninguna enfermedad específica (Salminen *et al.*, 2011). El envejecimiento cerebral se caracteriza por una disminución gradual de la función y el deterioro de las funciones sinápticas en regiones específicas, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal que intervienen en los procesos cognitivos (Lynch *et al.*, 2006).

Se ha señalado una interrelación entre la disfunción cognitiva y la formación de proteínas mal plegadas en relación con la edad. El daño en la maquinaria celular que conduce al aumento de plegamiento anómalo, agregación y acumulación de proteínas es debido en parte al declive gradual del sistema de chaperonas y foldasas implicadas en la UPR (Macario y Macario, 2002; Berridge, 2002). En la mayoría de las enfermedades relacionadas a la edad, las proteínas o fragmentos de proteínas son transformados de sus formas nativas solubles a fibrillas insolubles o placas, que se acumulan como agregados en una variedad de órganos, entre otros el retículo endoplásmico (Rattan y Clark, 2005).

Durante el envejecimiento, hay un cambio en el equilibrio entre la respuesta adaptativa protectora de la UPR y la señalización proapoptótica, donde la vía protectora se reduce significativamente y al vía apoptótica se hace predominante (Paz *et al.*, 2006; Hussain y Ramaiah, 2007; Naidoo *et al.*, 2008). Las chaperonas y otras enzimas claves en el proceso de plegamiento de proteínas, residentes en el RE,

como GRP78/BIP, PDI, calnexina y GRP94 se deterioran durante el proceso de envejecimiento. Las chaperonas se oxidan progresivamente con la edad y este proceso puede contribuir a su deterioro funcional. Esta alteración significativa en la oxidación se correlaciona con la reducción en la actividad enzimática de varios chaperonas (Nuss *et al.*, 2008). En este sentido, los niveles de expresión de proteínas y ARNm de GRP78/BIP aparecen disminuidos en el hipocampo de ratas Wistar de 23-26 meses de edad, comparados con los de jóvenes de 4-6 meses de edad (Paz *et al.*, 2006). Estas diferencias no se limitan al cerebro, la expresión de la proteína GRP78/BIP en el cerebro (corteza y cerebelo) y en el tejido periférico (pulmón, hígado, riñón, corazón, y el bazo) de ratas Wistar es mayor en el tejido joven en comparación con el tejido envejecido (Hussain y Ramaiah, 2007).

Inflamación e isquemia

La inflamación es la primera línea de defensa contra la infección o daño a los tejidos. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva puede llegar a dar lugar a daños en el tejido neural, incluso mayor que el causado por el estímulo inicial. Las neuronas tienen poca o ninguna capacidad de dividirse y poca capacidad para la recuperación de una lesión, por lo que se convierten en extremadamente vulnerables a los procesos autodestructivos, como el desencadenado por la inflamación (Gao *et al.*, 2003).

El punto de partida de la respuesta inflamatoria en el cerebro es la activación de la población de células gliales. Las dos poblaciones gliales involucradas en el proceso son las células de astroglia y las células de microglía, siendo estas últimas la

primera población que comienza a activarse durante el proceso inflamatorio. Algunos tipos de células tales como oligodendrocitos, no están involucrados en este tipo de activación (Gao *et al.*, 2003). Los astrocitos además de su papel en el control de la homeostasis y en la formación de la barrera hematoencefálica, participan en la respuesta al daño neuronal mediante un proceso denominado astrogliosis. En este proceso, dejan su estado inactivo, se hipertrofian, aumentan la expresión de los filamentos intermedios, especialmente nestina, vimentina y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y aumentan su proliferación (Pekny y Nilsson, 2005; Buffo *et al.*, 2008). Además en su estado reactivo los astrocitos continúan dividiéndose y emigran hacia la zona de daño formando una barrera denominada cicatriz glial, que libera numerosos factores que median la respuesta inflamatoria del tejido y sufre una remodelación después de la lesión (Silver y Miller, 2004). En condiciones patológicas de hipoxia/isquemia, la microglía activada adquiere las características de las células fagocíticas y citotóxicas, contribuye a aumentar el proceso inflamatorio, y participa en la remodelación del tejido nervioso después de la lesión. La microglía activada precede a la infiltración de macrófagos (Schilling *et al.*, 2003; Günther *et al.*, 2005). La señalización intercelular entre astrocitos y microglía parece desempeñar un papel más importante en los acontecimientos patológicos que en los fisiológicos (Nedergaard *et al.*, 2003).

La infiltración de neutrófilos y macrófagos en el sistema nervioso central como consecuencia de la rotura de la barrera hematoencefálica tras el daño isquémico, aumenta la generación de radicales libres contribuyendo a la pérdida de la integridad vascular y aumentando la muerte celular. Sin embargo, se requiere la respuesta de

los macrófagos y microglía después de la isquemia, para eliminar los desechos celulares y facilitar la plasticidad neuronal (Danton y Dietrich, 2003).

Tratamiento antiinflamatorio

En la última década, muchos estudios han demostrado los efectos beneficiosos de las terapias anti-inflamatorias en la isquemia cerebral. En este sentido, se han descrito como neuroprotectoras frente a la isquemia las terapias que reducen leucocitos, previenen la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión o inhiben la COX-2 (ciclooxigenasa 2) y la iNOS (Iadecola y Alexander, 2001; Del Zoppo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1994; Yrjänheikki *et al.*, 1999).

El meloxicam [4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1 ,2-benzotiazina-3-carboxamida-1 ,1-dióxido] es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo de la clase ácida enolcarboxamida (Stoffels *et al.*, 2011). Este fármaco inhibe las ciclooxigenasas, evitando la síntesis de la prostaglandina H₂, precursora de mediadores que provocan dolor e inflamación (Bourque *et al.*, 2010). El meloxicam inhibe de forma preferencial la COX-2, una enzima cuya activación contribuye a la lesión cerebral isquémica. La vida media en el plasma de este antiinflamatorio es de aproximadamente 20 horas y es transformado en cuatro metabolitos farmacológicamente inactivos, que son excretados en la orina y/o las heces (Davies y Skjodt, 1999; Gates *et al.*, 2005).

La COX-2 en el cerebro se expresa principalmente en la corteza, hipocampo, hipotálamo y particularmente en las neuronas, pero también en las células no

neuronales como astrocitos, células de microglía, células de las meninges y de los plexos coroideos (Vane *et al.*, 1998). En los diferentes modelos animales utilizados para simular la isquemia cerebral se ha observado un aumento en la expresión de la COX-2 (Collaço-Moraes *et al.*, 1996; Miettinen *et al.*, 1997). También se ha descrito este aumento en pacientes humanos después de un episodio isquémico letal (Sairanen *et al.*, 1998; Iadecola *et al.*, 1999). En modelos de isquemia cerebral focal con oclusión permanente de la arteria cerebral medial se ha descrito que, a las 24 horas, el aumento en la expresión de la COX-2 es proporcional al daño, lo que sugiere un papel central para esta enzima en la neurodegeneración inducida por isquemia (Collaço-Moraes *et al.*, 1996). La inhibición selectiva de la COX-2 disminuye el tamaño de la lesión cerebral después del proceso isquémico (Nogawa *et al.*, 1997), incluso cuando se administra 24 h después del inicio de la isquemia (Candelario-Jalil *et al.*, 2002). Estos datos proporcionan evidencias adicionales del papel de esta enzima en el proceso de neurodegeneración.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

En este estudio se ha planteado como hipótesis de trabajo que **la edad es un factor que aumenta la vulnerabilidad a la isquemia a través de la modificación de la expresión de los genes de la UPR y la respuesta inflamatoria**. Para verificar la hipótesis, se realizó un estudio en un modelo de isquemia global, en el que se analizó la respuesta a la isquemia cerebral tras 48 horas de reperfusión, comparando la respuesta entre animales jóvenes y viejos. Adicionalmente, se analizó el efecto del tratamiento con un agente antiinflamatorio de uso habitual en la clínica veterinaria. Para realizar el estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Caracterización del efecto de la I/R en la expresión de una serie de genes que se consideran marcadores básicos de UPR: PDI, GRP78/BIP y GRP94 y mortalidad: CHOP.

Este objetivo pretende responder a las preguntas: ¿La edad modifica la transcripción génica de genes cruciales en la respuesta al estrés de retículo? ¿Existen diferencias en los niveles de estas proteínas como consecuencia de la edad en tiempos de supervivencia que se consideran claves en la zona de penumbra isquémica? Para cuantificar la expresión de estos genes se han comparado los niveles de sus transcritos y la respuesta postraducciona en animales jóvenes y viejos mediante ensayos de PCR en tiempo real e inmunomarcado.

- 2) Caracterización del efecto del agente antiinflamatorio meloxicam en los genes indicados en el objetivo 1.

La respuesta inflamatoria juega un papel crucial en el daño postisquémico. La inflamación estéril aumenta en gran medida este daño y su repercusión sobre la UPR podría jugar un importante papel en la mortalidad celular. Este objetivo pretende responder a la pregunta: ¿modificando la respuesta inflamatoria se altera la respuesta al estrés de retículo? Para realizar este objetivo se han utilizado los mismos métodos indicados en el objetivo anterior.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Animales

En este trabajo se han utilizado ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa *Sprague-Dawley* de 3 meses (n=23) y 18 meses (n=20), con un peso de 350-450 g para los animales de 3 meses y de 600-800 g para los de 18 meses. Estos animales se obtuvieron de los laboratorios Charles River (Barcelona, España) y se mantuvieron en el Animalario de la Universidad de León bajo condiciones controladas durante todo el estudio: 3 animales por jaula, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 55%, con libre acceso a comida y agua. En cada grupo de edad, los animales se dividieron de manera aleatoria en dos grupos (*sham* y isquémico). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas contenidas en la Guía del Consejo de la Unión Europea (86/609/EU), siguiendo la regulación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) para el uso de animales de laboratorio. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Científico de la Universidad de León y, en todo momento, se intentó reducir al mínimo el número de animales, minimizando el sufrimiento de los mismos.

Isquemia global transitoria

Como paso previo al procedimiento quirúrgico, el animal fue colocado en la caja de inducción de anestesia, a la cual se hace llegar halotano al 4% (Fluothane, AstraZeneca ®) con un flujo de 3 L/min de oxígeno al 100%. Tras la inducción, el

animal se dispone sobre una manta térmica y se controla su temperatura corporal de forma permanente mediante una sonda rectal ($36 \pm 1^{\circ}\text{C}$) a lo largo de toda la operación quirúrgica. La anestesia fue mantenida con dosis de 1,5 a 2,5% de halotano en 800 mL/min en 100% de oxígeno usando una mascarilla adaptada a su tamaño. A continuación, se procedió al afeitado y desinfección de las zonas en las que se realizó la cirugía. El procedimiento quirúrgico se inició con una incisión longitudinal en la parte anterior del cuello para exponer las arterias carótidas comunes, dejándolas aisladas y preparadas hasta el momento de su oclusión como muestra la figura 9.

Figura 9. Arteria carótida. Se muestra la arteria carótida expuesta y sujeta con una sutura.

Seguidamente se expuso la arteria femoral, en la que se introdujo un catéter conectado a un transductor de presión para controlar de forma continuada la presión arterial de la rata durante todo el procedimiento y para la administración del hipotensor trimetafán (cedido por Roche) a una concentración de 15 mg/mL y un flujo de 0,3 mg/minuto.

Figura 10. Las figuras muestran la canulación de la arteria femoral. En la imagen de la izquierda se muestra el inicio de la inserción y en la imagen de la derecha la arteria canulada.

El trimetafán se utilizó para generar en la rata una hipotensión moderada (40-50 mm Hg). Una vez alcanzado el nivel de hipotensión, se indujo la isquemia global transitoria mediante la oclusión de las arterias carótidas con clips específicos (*atraumatic aneurysm clips*) durante 15 minutos. Durante este tiempo, la hipotensión se mantuvo controlada ajustando el flujo de halotano, ya que tiene un efecto hipotensor intrínseco (Bendel *et al.*, 2005; Degoute, 2007). Una vez finalizado el proceso isquémico, y tras la recuperación de la presión arterial, se eliminó el catéter y se suturaron las incisiones. Cuando el animal se recuperó de la anestesia, se mantuvo en observación durante 2-3 horas y después se trasladó a la sala de cuarentena del animalario que mantiene las condiciones estándar indicadas previamente. Cada animal operado se mantuvo aislado en su propia jaula. En el caso de los animales *sham*, se llevó a cabo exactamente el mismo procedimiento, con la excepción de la oclusión de las arterias carótidas.

Figura 11. La imagen muestra el clampado de una arteria carótida.

Tratamiento antiinflamatorio

Para determinar si la inflamación está implicada en la modificación de la respuesta transcripcional de la UPR a la isquemia, hemos utilizado el agente antiinflamatorio no esteroideo (meloxicam). Para ello fueron utilizados 10 animales de 3 meses, de los cuales 5 animales se utilizaron como *sham* y otros 5 fueron sometidos a I/R. Las ratas fueron tratados por vía subcutánea con meloxicam (0,5 mg/kg) (Boehringer Ingelheim, España) 1 hora y 24 horas después de la cirugía. Cinco ratas con operación simulada y cinco sometidas a isquemia-reperfusión (I/R), de 18 meses de edad, fueron también tratadas con meloxicam, pero ninguno de los animales I/R sobrevivió durante más de 36 horas.

Obtención de muestras

Dos días después de la isquemia global transitoria, los animales fueron decapitados, los cerebros se extrajeron rápidamente utilizando material quirúrgico

esterilizado y tratado con la solución RNAsa Zap para evitar la contaminación con ARNasas. Los encéfalos se dispusieron sobre una matriz para cerebro de roedor que permite obtener secciones parasagitales de grosor uniforme (hasta 1 mm). Se realizaron secciones situando una cuchilla a 1 mm de la línea media y otra a 3 mm de la línea media. Bajo la lupa, de estas secciones fueron disecadas las regiones hipocampales CA1 y CA3, el giro dentado (GD) y la corteza cerebral (CX) que recubre al hipocampo. Las muestras disecadas se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción de ARN y transcripción inversa (RT)

Para la extracción de ARN total se utilizó el reactivo Tripure™ (Roche, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se incubó con ADNasa I (0,5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C para prevenir la posible contaminación de ADN. La integridad del ARN obtenido se midió utilizando el kit *Experion RNA HighSens Analysis* siguiéndose las recomendaciones del fabricante. La proporción 28S/18S de todas las muestras obtenidas, tanto de animales jóvenes como viejos, *sham* e isquémicos, se mantuvo entre 1,8-2, que se considera un valor indicativo de la buena integridad del ARN. La determinación de la concentración del ARN extraído se llevó a cabo midiendo la proporción de absorbancia 260/280 nm de las alícuotas de ARN precipitadas con etanol, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, California). La cantidad de ARN obtenida en todas las muestras fue similar oscilando entre 0,5-0,7 µg/mg de tejido. Para realizar la retrotranscripción del ARNm se utilizaron cebadores aleatorios (*random hexamer*

primers) y se partió de 600 ng de ARN total de cada muestra como molde. La retrotranscripción se efectuó con el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, California) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

PCR en tiempo real

Después de la retrotranscripción, el ADN complementario (ADNc) se diluyó (1/10) en agua milliQ estéril y fue usado como molde en los ensayos de PCR en tiempo real. Para la búsqueda de las secuencias de ARNm y diseño de cebadores se utilizó la base de datos *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer Express*. En el diseño se tuvo en cuenta que entre el cebador directo y el inverso hubiera una secuencia intrónica para asegurar la ausencia de contaminación de ADN genómico. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta tesis se indican en la tabla 2.

GEN	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'-3')	Genebank
GAPDH	GGGCAGCCCAGAACATCA	TGACCTTGCCCACAGCCT	NM_017008
PDI	CTGCTGTTCTGCCCCAAGAGTGT	TGGCTCATCAGGTGGGGCTTG	NM_012998
Grp78	CGTCCAACCCGGAGAACA	ATTCCAAGTGCGTCCGATG	NM_013083
Grp94	GTGGGTGCTGGGCCTCT	GACTTCATCGTCAGCTCTCACA	NM_001012197
CHOP	GCATCCCTAGCTTGGCTGACT	ATCTGGAGAGCGAGGGCTTT	NM_001109986

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados en este estudio así como su número de acceso en *GeneBank*.

En los ensayos de PCR en tiempo real se utilizó *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, California) como marcador de fluorescencia. La amplificación se

realizó en el termociclador *Step-One-Plus™*. Como paso previo a la cuantificación de transcritos de los distintos genes, se determinó la eficiencia para cada pareja de cebadores con cantidades crecientes de una muestra de ADNc. La eficiencia se calcula representando los valores de ciclo umbral (Ct: cycle threshold) frente al logaritmo de las concentraciones de ADNc utilizadas, siendo el valor Ct el número del ciclo en el que la fluorescencia de la muestra cruza el umbral de fluorescencia. La recta obtenida presenta una pendiente que se utiliza en el cálculo de la eficiencia mediante la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

Las parejas de cebadores con eficiencias inferiores al 90% se descartaron. Los reactivos necesarios para la realización de la PCR en tiempo real aparecen reflejados en la tabla 3.

Componente de la reacción	Volumen (µl)
Cebador (reverso) 10 µM	0,6
Cebador (directo) 10 µM	0,6
SYB® Green PCR Master Mix 2X	10
Agua	6,8
ADNc diluido en agua autoclavada	2,0

Tabla 3. Enumeración de los diferentes componentes de una reacción de PCR a tiempo real.

Las condiciones utilizadas para realizar los ensayos de PCR en tiempo real fueron las siguientes:

- a) Un ciclo de 2 min a 50°C para la activación de la enzima.

- b) Un ciclo de 10 min a 95°C para desnaturalizar el ADNc.
- c) Cuarenta ciclos de 15 s a 95°C (desnaturalización) y 1 min a 60°C (hibridación/elongación).
- d) 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C (curva de disociación para comprobar que los cebadores son específicos del fragmento que se desea amplificar).

Los incrementos en fluorescencia producidos durante el proceso de amplificación se analizaron con el programa Sequence Detector.

Para llevar a cabo la normalización se realizó como referencia el gen de la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH).

Los resultados se compararon por el método del $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001). Así, los niveles de ARNm de cada gen, normalizados frente a GAPDH se expresan como $2^{-\Delta Ct}$. El cambio relativo como consecuencia de la I/R en los niveles de transcritos de los genes estudiados frente a los de los animales *sham* se expresó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ siendo:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gen estudiado}} - Ct_{\text{GAPDH}})$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen estudiado}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{animales isquémicos}} - (Ct_{\text{gen estudiado}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{animales sham}}$$

Los procedimientos de PCR cuantitativa fueron realizados siguiendo los criterios MIQE (Minimal Information for Publication of qPCR Experiments) (Taylor *et al.*, 2010).

Ensayos de Western Blot

La proteína total se obtuvo paralelamente al proceso de extracción de ARN mediante Tripure™ indicado en el apartado anterior, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de proteínas obtenidas se determinaron utilizando el método de Bradford (BioRad, California) y se almacenan en 8M de urea y SDS al 4%, en presencia de un inhibidor de la proteasa (cóctel inhibidor de proteasa completo, libre de EDTA I, (Roche, Alemania). Los ensayos se realizaron cargando 30 µg de proteína por pocillo en geles de poliacrilamida al 10%. La electroforesis (SDS-PAGE) se realizó a 110 V durante 120 minutos. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia en seco (Invitrogen, California) a 20 V durante 7 minutos. Tras la transferencia de proteínas, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en tampón tris salino (TBS) conteniendo el detergente Tween-20 al 0,2% (TBS-T) y 5% de leche desnatada, para bloquear la unión inespecífica de inmunoglobulinas. A continuación, las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche con su correspondiente anticuerpo primario (véase tabla 4), diluidos en una solución de leche desnatada al 2,5% en TBS-T.

PROTEÍNA	ANTICUERPO	Concentración	PESO MOLECULAR
GRP78	Policlonal de conejo Abcam	1 µg/ml	78 kDa
PDI	Monoclonal de ratón Abcam	1 µg/ml	58 kDa
β-actina	Monoclonal de ratón Sigma, clon AC-74	0,7 µg/ml	42 kDa

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de *Western blot*, incluyendo la dilución utilizada para cada uno de ellos y el peso molecular de la proteína que identifican.

Tras la incubación en anticuerpo primario y los correspondientes lavados en TBS-T, las membranas se incubaron durante 60 minutos con los respectivos anticuerpos secundarios cabra anti-conejo y cabra anti-ratón (Dako, Dinamarca) conjugados con peroxidasa, diluidos (1/3000) en una solución de leche desnatada al 2,5% en TBS-T. A continuación, las membranas de nitrocelulosa se aclararon en TBS y se incubaron con Chemiluminiscence Luminol Reagent (Santa Cruz Biotech, España), con luz ambiental, durante 5 minutos y en agitación. La exposición y revelado de las membranas se realizó en oscuridad. Las membranas, yuxtapuestas con láminas de fotografía en un chasis apropiado (Kodak X-Omatic) durante un tiempo de 1–5 minutos (dependiendo del anticuerpo) se revelaron con revelador D-19 (Kodak) durante 2 minutos a 25°C y agitación; la reacción se detuvo por inmersión de las láminas en una solución de ácido acético al 2%. Finalmente, se procedió a la inmersión de las mismas en solución fijadora durante 5 minutos seguido de un abundante aclarado en agua corriente. La cuantificación de la densidad óptica de las bandas se realizó con el programa ImageJ (software ImageJ, NIH, USA).

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media $\pm$ desviación típica de la media. Se realizaron ensayos de ANOVA de 2 vías para buscar interacciones entre edad e isquemia o entre isquemia y tratamiento con meloxicam. Se utilizó el test post-hoc no paramétrico de Bonferroni para determinar los valores significativos para cada edad (3 meses o 18 meses de edad) o tratamiento (animales tratados con meloxicam

o no tratados) entre el grupo isquémico y su correspondiente grupo *sham*. La significación se fijó en el nivel de confianza del 95%. La estadística el análisis se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, California).

RESULTADOS

RESULTADOS

Efecto de la edad y de la isquemia/reperfusión

Para cuantificar el efecto de la edad en la expresión de la respuesta de las proteínas mal plegadas en la corteza cerebral y en el área del hipocampo (CA1, CA3 y GD), se compararon los dos grupos de edad estudiados, tanto los animales sometidos a isquemia como los animales *sham*, utilizando como parámetros tanto niveles de ARNm como de proteínas. Se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes relacionados con la UPR que se consideran más representativos incluyendo PDI, GRP78/BIP Y GRP94, así como del factor de transcripción proapoptótico CHOP. Los niveles de expresión de ARNm de estos genes se normalizaron con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH y se representan como el incremento (o disminución) de los niveles de animales viejos con respecto a los animales jóvenes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), tanto en animales *sham* como en animales sometidos a isquemia reperfundida. También se estudiaron los niveles de proteína de PDI y GRP78/BIP caracterizados mediante la técnica de Western blot.

Para cuantificar el efecto de la I/R en la UPR se estudiaron los mismos marcadores utilizados para analizar el efecto de la edad. Los niveles de ARNm normalizados de estos marcadores con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH se representan como el incremento (o disminución) de los transcritos de los animales sometidos a I/R con respecto a los animales *sham*, tanto en animales viejos como en animales jóvenes.

A continuación se muestran los resultados para cada uno de los marcadores utilizados. Como paso previo se analizaron varios genes housekeeping (GAPDH, β -actina y β -tubulina) para determinar cuál es el más estable en las diferentes condiciones. El GAPDH fue estable en todas las condiciones analizadas. A continuación se detallan los datos de los diferentes marcadores utilizados.

PDI

En la figura 12 se muestran los resultados de los niveles de ARNm normalizados de PDI, una chaperona de la luz del retículo endoplásmico. Comparando los efectos de la edad, en las ratas *sham* de 18 meses se observa un aumento significativo de PDI en CA1 con relación a los animales jóvenes (representados por la línea de puntos en la figura, valor 1). El resto de las estructuras cerebrales estudiadas: CA3, GD y CX no presentan diferencias significativas con respecto a los valores observados en los animales jóvenes.

La figura 12 también muestra el efecto de la edad en los niveles de ARNm de la chaperona PDI estudiada en los animales sometidos a I/R. En este caso se puede observar que, en todas las estructuras, en los animales de 18 meses los niveles de PDI son significativamente más bajos que en los animales de 3 meses sometidos a isquemia.

En todas las estructuras los incrementos observados en los animales *sham* viejos con respecto a los jóvenes fueron significativamente más altos que los observados en los animales viejos sometidos a I/R comparados con los animales jóvenes sometidos a I/R (Figura 12).

Figura 12 Efecto de la edad en los niveles de ARNm de PDI. Incremento de los niveles de ARNm normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales viejos con respecto a los niveles normalizados con respecto a GAPDH de los animales jóvenes ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores correspondientes a los animales viejos *sham* se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas con respecto a los animales jóvenes se indican con * y las diferencias entre los animales *sham* viejos y sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

El efecto de la I/R se muestra en la figura 13. Se observa que en los animales jóvenes sometidos a I/R aparecen niveles de transcritos de PDI significativamente

más altos que en los animales *sham* jóvenes. Este incremento en los niveles de ARNm de PDI se observa también en casi todas las estructuras de los animales viejos pero de forma menos notable, y de hecho, en todos los casos el aumento en los jóvenes es significativamente más alto que en los viejos.

PDI. Efecto de la I/R

Figura 13. Efecto de la I/R en los niveles de ARNm de PDI. Incremento de los niveles de ARNm de PDI normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de PDI normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales jóvenes sometidos a I/R se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos sometidos a I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales

sham se indican con * y las diferencias entre los animales jóvenes sometidos a I/R con respecto a los animales viejos sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

El efecto del tratamiento con meloxicam se realizó en animales jóvenes de 3 meses de edad y se muestra en la figura 14. Se observa como en todos los casos el tratamiento con meloxicam reduce los niveles de ARNm de PDI con respecto a los niveles de sus correspondientes animales *sham* tratados con meloxicam (columnas negras). Esto contrasta con el incremento en los niveles de ARNm de PDI inducido por I/R en ausencia del tratamiento con meloxicam (columnas blancas). Se observa que el tratamiento con meloxicam reduce completamente la respuesta inducida por la I/R eliminando los incrementos de ARNm del PDI observados en los animales no tratados con el agente antiinflamatorio.

Figura 14. Efecto del tratamiento con meloxicam en los niveles de ARNm de PDI.

Incremento de los niveles de ARNm de PDI normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de PDI normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales no tratados con meloxicam se representan como columnas blancas y valores de los animales tratados con este fármaco como columnas negras. Se muestra la respuesta del tratamiento en las diferentes regiones estudiadas: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX). Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales sometidos a I/R tratados con meloxicam con respecto a los animales jóvenes sometidos a I/R no tratados con meloxicam se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

Los ensayos de Western blot, representados en la figura 15, muestran la expresión de la proteína PDI. Con respecto al efecto de la edad, en el hipocampo se observaron niveles similares de PDI en el hipocampo en los animales *sham* jóvenes y viejos, sin embargo, en la corteza cerebral, los niveles de esta proteína fueron más altos en los animales *sham* viejos que en los animales *sham* jóvenes (compárense columnas 5 y 1 en las distintas estructuras de la figura 15, significación indicada por #). Sin embargo los niveles de PDI de animales viejos sometidos a I/R son significativamente más bajos en CA3 y CX de las ratas de 18 meses comparados con los de animales de 3 meses sometidos a isquemia (compárense columnas 6 y 3 de la figura 15, significación indicada por #).

Con respecto al efecto de la I/R se puede destacar el aumento significativo en CX y GD en los animales jóvenes (compárense columnas 1 y 3 de la figura 15, significación indicada por *). Sin embargo, en los animales viejos la I/R dio lugar a descensos significativos en CX y CA3 y aumentos significativos en CA1 y GD (compárense columnas 6 y 5 de la figura 15, significación indicada por *).

Figura 15: Modificaciones en la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Efecto de la I/R, edad y meloxicam sobre los niveles de PDI (55 kDa) en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, en el giro dentado (GD) y en la corteza cerebral (CX) tras 48 horas de reperusión después de la isquemia. Se muestran bandas de PDI representativas y las correspondientes bandas de beta-actina procedentes de los ensayos de Western blot. Se indican los promedios de los análisis densitométricos (media de la densidad óptica $\pm$ SEM) de PDI normalizados frente a la β -actina (40 kDa). Los diferentes carriles muestran las bandas de PDI y β -actina correspondientes a animales jóvenes *sham* (3MS), animales jóvenes *sham* tratados con meloxicam (3MS + meloxicam), animales jóvenes sometidos a isquemia

reperfusion (3MI/R), animales jóvenes sometidos a isquemia reperfusion tratados con meloxicam (3MI/R + meloxicam), animales viejos *sham* (18MS) y animales viejos sometidos a isquemia /reperfusion (18MI/R). * Indica diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a animales *sham* (comparación entre columnas 3 y 1 o 6 y 5), # indica diferencias significativas dependientes de la edad (comparación entre columnas 5 y 1 o 6 y 3) y ¥ indica diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con meloxicam (comparación entre columnas 2 y 1 o 4 y 3) ($p < 0,05$). ANOVA de dos vías ($n = 5$).

El tratamiento con meloxicam muestra importantes diferencias entre el hipocampo y la corteza cerebral. Se puede observar que en el hipocampo el tratamiento con meloxicam tiende a disminuir los niveles de PDI en el hipocampo aunque no siempre estas diferencias son significativas (compárense columnas 1 y 2 de la figura 15, y las columnas 4 y 3, significación indicada por ¥). En contraste en la corteza cerebral aumentan significativamente los niveles de PDI como consecuencia del tratamiento con meloxicam, tanto en animales *sham* como en animales sometidos a I/R.

GRP78/BIP

En la figura 16 se muestra el incremento de los niveles de ARNm de la chaperona del retículo endoplásmico, GRP78/BIP, de animales viejos comparados con animales jóvenes (representados como nivel 1, línea de puntos). Únicamente en el área CA3 se detectaron diferencias significativas dependientes de la edad cuando se compararon los niveles de ARNm de GRP78/BIP entre animales de 18 y de 3 meses en animales *sham*.

La figura 16 también muestra las proporciones de los niveles de ARNm de GRP78/BIP en animales viejos sometidos a I/R, comparados con animales jóvenes sometidos a I/R. En este caso, los niveles de ARNm de la chaperona GRP78/BIP son significativamente más bajos en los animales de 18 meses isquémicos, en las áreas hipocampales (excepto CA1) y en la corteza cerebral.

En todas las estructuras los incrementos observados en los animales *sham* viejos con respecto a los jóvenes fueron significativamente más altos que los observados en los animales viejos sometidos a I/R comparados con los animales jóvenes sometidos a I/R (Figura 16).

Figura 16. Efecto de la edad en los niveles de ARNm de GRP78/BIP. Incremento de los niveles de ARNm normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales viejos con respecto a los niveles normalizados con respecto a GAPDH de los animales jóvenes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales viejos *sham* se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas con respecto a los animales jóvenes se indican con * y las diferencias entre los animales *sham* viejos y sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

El efecto de la I/R en los transcritos de GRP78/BIP se muestra en la figura 17. Se observa que en los animales jóvenes sometidos a I/R aparecen niveles de

transcritos de PDI significativamente más altos que en los animales *sham* jóvenes. Por el contrario, en los animales viejos se observan descensos significativos tanto en la corteza cerebral como en CA3, y en CA1 y GD no se observan diferencias significativas con respecto a sus correspondientes animales *sham*. En todas las estructuras estudiadas se observan diferencias significativas en los transcritos de GRP78/BIP cuando se compara la respuesta a la I/R entre animales jóvenes y animales viejos.

Figura 17. Efecto de la I/R en los niveles de ARNm de GRP78/BIP. Incremento de los niveles de ARNm de GRP78/BIP normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de GRP78/BIP normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales jóvenes sometidos a I/R se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos sometidos a I/R como

columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (DG) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales jóvenes sometidos a I/R con respecto a los animales viejos sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

El efecto del tratamiento con meloxicam realizado en animales jóvenes de 3 meses de edad se muestra en la figura 18. En los animales no tratados con meloxicam se observa que la I/R induce aumentos significativos en los niveles de ARNm de GRP78/BIP con respecto a los animales *sham* no tratados en todas las estructuras estudiadas. El tratamiento con meloxicam reduce completamente la respuesta inducida por la I/R de modo que los niveles de ARNm de GRP78/BIP son similares en los animales sometidos a I/R y animales *sham*.

Los niveles de expresión de la proteína GRP78/BIP obtenidos en ensayos de Western blot se representan en la figura 19. Con respecto a los efectos de la edad, en los animales *sham*, no se detectaron diferencias significativas dependientes de la misma en los niveles de GRP78/BIP en CA1, GD y CX sin embargo, en CA3 los niveles de esta proteína son significativamente más bajos en CA3 (compárense columnas 5 y 1 en las distintas estructuras de la figura 19, significación indicada por #). El efecto de la edad en los animales sometidos a I/R muestra niveles asociados a la misma más bajos en CA3 y CX, más altos en CA1 y no se encontraron diferencias significativas en GD (compárense columnas 6 y 3 en las distintas estructuras de la figura 19, significación indicada por #).

Figura 18. Efecto del tratamiento con meloxicam en los niveles de ARNm de GRP78/BIP.

Incremento de los niveles de ARNm de GRP78/BIP normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de GRP78/BIP normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales no tratados con meloxicam se representan como columnas blancas y los valores de los animales tratados con este fármaco como columnas negras. Se muestra la respuesta del tratamiento en las diferentes regiones estudiadas: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX). Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales sometidos a I/R tratados con meloxicam con respecto a los animales jóvenes sometidos a I/R no tratados con meloxicam se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

Figura 19: Efectos de la edad, la I/R y el meloxicam sobre los niveles de GRP78/BIP. La figura muestra ensayos representativos de la proteína GRP78/BIP y la β -actina en ensayos de Western blot. Las gráficas indican los promedios del análisis densitométrico de GRP78/BIP (78 KDa) normalizado frente a β -actina (40 kDa). Se representan los resultados en las diferentes regiones analizadas: regiones 1 (CA1) y 3 (CA3) del *cornu ammonis* del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX). Las muestras se han obtenido a partir de animales de 3 y 18 meses 48 horas después de isquemia global o su simulación (*sham*). Los diferentes carriles corresponden a 1) 3MS, 3)

3MI/R, 5) 18MS y 6) 18MI/R. El efecto del tratamiento con meloxicam en animales *sham* y animales sometidos a I/R se muestra en los carriles 2) 3MS + Mx) y 3) MI/R + Mx. Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a los correspondientes animales *sham* se indican con *, las diferencias significativas dependientes de la edad con # y las diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con meloxicam con ¥ ($p < 0,05$. ANOVA de dos vías, $n = 5$)

Con respecto al efecto de la I/R, el giro dentado de los animales jóvenes sometidos a I/R presenta un descenso significativo de GRP78/BIP comparado con el de los animales jóvenes *sham*, en contraste con los aumentos significativos observados en la corteza cerebral y CA3. No se detectaron diferencias entre animales tratados y no tratados en CA1 (compárense columnas 3 y 1 de la figura 19, significación indicada por *). En los animales viejos se pudo observar un aumento significativo dependiente de la I/R en CA1 y CA3, pero CX presentó un descenso significativo. No se observaron diferencias en GD (compárense las columnas líneas 6 y 5 de la figura 19, significación indicada por *).

El tratamiento con meloxicam muestra diferencias entre el hipocampo y la corteza cerebral. En el hipocampo, el tratamiento con meloxicam solamente muestra disminuciones significativas en los niveles de GRP78/BIP en CA1 y CA3 de los animales tratados con I/R el hipocampo. En la corteza cerebral, el tratamiento con meloxicam aumenta los niveles de GRP78/BIP en los animales *sham* tratados con meloxicam pero no se observan diferencias son significativas en los animales sometidos a I/R tratados con meloxicam (compárense columnas 1 y 2 de la figura 19, y las columnas 4 y 3, significación indicada por ¥).

GRP94

El incremento de los niveles de ARNm de la chaperona GRP94 de animales viejos comparados con animales jóvenes (representados como nivel 1, línea de puntos) se muestra en la figura 20. Únicamente en el área CA3 se detectaron diferencias significativas dependientes de la edad cuando se compararon los niveles de ARNm de GRP94 entre animales de 18 y de 3 meses en animales *sham*.

En esta figura se pueden también observar las proporciones de los niveles de ARNm de GRP94 en animales viejos sometidos a I/R, comparados con animales jóvenes sometidos a I/R. Los niveles de ARNm de la chaperona GRP94 son significativamente más bajos en los animales de 18 meses isquémicos, en las áreas hipocampales (excepto CA1) y en la corteza cerebral.

A excepción de CA1, en el resto de las estructuras los incrementos observados en los animales *sham* viejos con respecto a los jóvenes fueron significativamente más altos que los observados en los animales viejos sometidos a I/R comparados con los animales jóvenes sometidos a I/R (Figura 20).

Los datos referentes al efecto de la isquemia/reperfusión cuando se estudian los niveles de los transcritos de GRP94 se muestran en la figura 21. Se observa que en los animales jóvenes sometidos a I/R aparecen niveles de transcritos de GRP94 significativamente más altos que en los animales *sham* jóvenes excepto en el área CA1 del hipocampo donde no se observan diferencias significativas.

GRP94. Efecto de la edad

Figura 20. Efecto de la edad en los niveles de ARNm de GRP94. Incremento de los niveles de ARNm normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales viejos con respecto a los niveles normalizados con respecto a GAPDH de los animales jóvenes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales viejos *sham* se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas con respecto a los animales jóvenes se indican con * y las diferencias entre los animales *sham* viejos y sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

GRP94. Efecto de la I/R

Figura 21. Efecto de la I/R en los niveles de ARNm de GRP94. Incremento de los niveles de ARNm de GRP94 normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de GRP94 normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales jóvenes sometidos a I/R se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos sometidos a I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales jóvenes sometidos a I/R con respecto a los animales viejos sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

En contraste, no existen prácticamente diferencias significativas en los niveles de transcritos de ARNm de GRP94 entre los animales viejos sometidos a I/R comparados con sus respectivos animales *sham*, excepto en CA3 donde se la I/R induce un descenso significativo de estos transcritos, como se observa en la figura 21. Excepto en CA1 donde no se observan diferencias, en el resto de estructuras estudiadas se observan diferencias significativas en los transcritos de GRP78/BIP cuando se compara la respuesta a la I/R entre animales jóvenes y animales viejos.

La figura 22 muestra el efecto del tratamiento con meloxicam realizado en animales jóvenes de 3 meses de edad. En los animales no tratados con meloxicam se observa que los animales sometidos a I/R existe un aumento significativo de los niveles de ARNm de GRP94 con respecto a los animales *sham* en prácticamente todas las estructuras (salvo CA1). El tratamiento con meloxicam reduce completamente la respuesta inducida por la I/R eliminando los incrementos de ARNm de GRP94 observados en los animales no tratados con el agente antiinflamatorio.

GRP94. Efecto del meloxicam

Figura 22. Efecto del tratamiento con meloxicam en los niveles de ARNm de GRP94.

Incremento de los niveles de ARNm de GRP94 normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de GRP78/BIP normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales no tratados con meloxicam se representan como columnas blancas y los valores de los animales tratados con este fármaco como columnas negras. Se muestra la respuesta del tratamiento en las diferentes regiones estudiadas: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (DG) y corteza cerebral (CX). Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales sometidos a I/R tratados con meloxicam con respecto a los animales jóvenes sometidos a I/R no tratados con meloxicam se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

Factor de transcripción proapoptótico: CHOP

La comparación de los incrementos de los niveles de ARNm de CHOP de animales viejos comparados con animales jóvenes (representados como nivel 1, línea de puntos) se muestra en la figura 23. Cuando se compararon los niveles de ARNm de CHOP entre animales de 18 y de 3 meses en animales *sham*, únicamente se detectaron descensos significativos dependientes de la edad en el giro dentado.

Esta comparación en animales viejos sometidos a isquemia con respecto a jóvenes sometidos a I/R mostró descensos significativos en todas las estructuras salvo en CA1 (Figura 23).

A excepción de CA1, en el resto de las estructuras los incrementos observados en los animales *sham* viejos con respecto a los jóvenes fueron significativamente más altos que los observados en los animales viejos sometidos a I/R comparados con los animales jóvenes sometidos a I/R (Figura 23).

Figura 23 Efecto de la edad en los niveles de ARNm de CHOP. Incremento de los niveles de ARNm normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales viejos con respecto a los niveles normalizados con respecto a GAPDH de los animales jóvenes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales viejos *sham* se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas con respecto a los animales jóvenes se indican con * y las diferencias entre los animales *sham* viejos y sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

En la figura 24 se muestran los datos referentes al efecto de la isquemia/reperfusión cuando se estudian los niveles de ARNm de CHOP. En todas las

estructuras estudiadas se observa que los animales jóvenes sometidos a I/R presentan niveles de transcritos de CHOP significativamente más altos que los animales *sham* jóvenes. La respuesta a la I/R en animales viejos es irregular. Así, se observan incrementos significativos en CA1, descensos significativos en CA3 y no se pueden detectar diferencias en el Giro dentado y en la corteza cerebral. Cuando se compara la respuesta a la I/R entre jóvenes y viejos no se observan diferencias significativas en CA1, pero en el resto de estructuras estudiadas los animales jóvenes muestran niveles de ARNm de CHOP significativamente más altos que los viejos.

Figura 24. Efecto de la I/R en los niveles de ARNm de CHOP. Incremento de los niveles de ARNm de CHOP normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de CHOP normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas

horizontales de puntos). Los valores de los animales jóvenes sometidos a I/R se representan como columnas blancas y los valores de los animales viejos sometidos a I/R como columnas negras. Regiones del asta de Amón: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX) para cada grupo de edad. Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales jóvenes sometidos a I/R con respecto a los animales viejos sometidos a I/R se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

La figura 25 muestra el efecto del tratamiento con meloxicam sobre los niveles de ARNm de CHOP realizado en animales jóvenes de 3 meses de edad. En los animales no tratados con meloxicam se observa que en los animales sometidos a I/R existe un aumento significativo de los niveles de ARNm de CHOP con respecto a los animales *sham* en prácticamente todas las estructuras. El tratamiento con meloxicam reduce completamente la respuesta inducida por la I/R eliminando los incrementos de ARNm de CHOP observados en los animales no tratados con el agente antiinflamatorio.

CHOP. Efecto del meloxicam

Figura 25. Efecto del tratamiento con meloxicam en los niveles de ARNm de CHOP.

Incremento de los niveles de ARNm de CHOP normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH de los animales sometidos a I/R con respecto a los niveles de ARNm de CHOP normalizados con respecto a GAPDH de los animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a los que se asigna un valor de 1 (indicado por las líneas horizontales de puntos). Los valores de los animales no tratados con meloxicam se representan como columnas blancas y los animales tratados con este fármaco como columnas negras. Se muestra la respuesta del tratamiento en las diferentes regiones estudiadas: *cornu ammonis* región 1 del hipocampo (CA1), *cornu ammonis* región 3 del hipocampo (CA3), giro dentado (GD) y corteza cerebral (CX). Las diferencias significativas entre animales sometidos a I/R con respecto a sus correspondientes animales *sham* se indican con * y las diferencias entre los animales sometidos a I/R tratados con meloxicam con respecto a los animales jóvenes sometidos a I/R no tratados con meloxicam se representan con # ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías, $n=5$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Efecto de la edad

En este trabajo se han abordado básicamente los cambios asociados a la edad en la expresión de algunos genes que se consideran cruciales en la UPR. En este sentido, la comparación entre animales *sham* jóvenes y viejos ha puesto de manifiesto que, en términos generales, no aparecen diferencias significativas asociadas a la edad en la expresión de los genes asociados a la UPR. Estos datos contrastan con una previsible disminución de la eficacia de la UPR como consecuencia de la edad que ha sido descrita previamente (Naidoo *et al.*, 2008). No obstante, dado que nuestra comparación del efecto de la edad está basada en la comparación de ratas *sham*, hay que considerar la existencia de un estrés quirúrgico inherente en ambas edades. Hasta donde sabemos, no existen datos que cuantifiquen el estrés inducido por cirugía en diferentes edades. Por tanto, la UPR puede cambiar como consecuencia de la edad, pero estos cambios pueden estar enmascarados o potenciados por el estrés quirúrgico dependientes de la edad.

La comparación de la respuesta entre animales jóvenes y viejos sometidos a daño isquémico contribuye a aclarar este aspecto. En contraste a lo observado en animales *sham*, la comparación en la respuesta observada entre animales jóvenes y animales viejos sometidos a I/R es muy significativa. En términos generales se observa que UPR inducida como consecuencia de la I/R (medida en términos de niveles de los transcritos de sus genes) es mucho más baja en los animales viejos

que en los animales jóvenes, lo que está de acuerdo con la disminución de la eficacia de la UPR asociada a la edad indicada previamente (Naidoo et al., 2008).

Por otra parte, el análisis de diferentes estructuras como las regiones hipocampales CA1, CA3 y CX en las que se ha descrito distinta vulnerabilidad a la isquemia (Gee *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2004; Kumari *et al.*, 2007; Stanika *et al.*, 2010; Vallet y Charpiot, 1994) muestra una cierta correlación con la respuesta a la edad. Así, en CA3 y corteza cerebral, estructuras consideradas menos sensibles a la I/R, se puede observar que el daño isquémico produce una UPR más baja en animales viejos (comparada con la UPR en jóvenes) que la observada en CA1, estructura más vulnerable a la I/R. Estas diferencias en la UPR entre regiones podrían ser responsables al menos en parte de su vulnerabilidad diferencial a la isquemia.

Las diferencias de vulnerabilidad se han descrito básicamente en animales jóvenes y nuestros datos de UPR sugieren que la vulnerabilidad diferencial entre estructuras sigue presente en animales viejos. Los datos de proteínas no muestran diferencias tan consistentes como las observadas en ARNm, sin embargo parece claro que los animales viejos sometidos a I/R presentan en la corteza cerebral niveles de chaperonas más bajos que los observados en los jóvenes. Esto concuerda con los datos de ARNm y confirma que la UPR inducida por I/R en la corteza cerebral es dependiente de la edad. En el hipocampo estos datos son más aleatorios y no queda tan clara esta dependencia.

Cabe destacar la clara diferencia en el patrón de transcritos de genes relacionados con la UPR entre los animales de 3 y 18 meses con lesión isquémica. En los animales jóvenes con lesión se observan aumentos significativos en los niveles de transcripción de todos los genes estudiados, mientras que las diferencias son apenas perceptibles en la mayoría de las estructuras en animales lesionados de más edad. Esta respuesta es consistente con los datos en roedores que describen un descenso asociado a la edad en la expresión de GRP78/BIP y PDI (Paz *et al.*, 2006; Hussain y Ramaiah, 2007; Naidoo *et al.*, 2008; Nuss *et al.*, 2008). Los datos también son consistentes con las respuestas transcripcionales más bajas observadas en los sistemas de genes glutamatérgicos y GABAérgicos cuando se comparan animales jóvenes con animales viejos sometidos a I/R (Llorente *et al.*, 2013b; Montori *et al.*, 2010a, b, c; Montori *et al.*, 2013; Naidoo *et al.*, 2008).

Curiosamente, en CA1, los niveles de ARNm de CHOP son similares tanto en animales *sham* jóvenes y viejos como en animales con daño isquémico jóvenes y viejos (ver Figura 23). También aparecen valores similares de expresión de CHOP entre animales *sham* viejos y jóvenes en el resto de las estructuras (salvo en el giro dentado). Sin embargo, la comparación entre animales jóvenes y viejos sometidos a isquemia pone de manifiesto una respuesta diferencial en la expresión de este gen que confirma los datos indicados antes en los marcadores de UPR y de los receptores glutamatérgicos y GABAérgicos. Es posible un enmascaramiento debido al estrés quirúrgico en la expresión de este gen.

En los estudios basados en los niveles de proteína, nuestros datos también apoyan la idea de que los animales viejos presentan una disminución de su capacidad para activar la UPR inducida por isquemia. Nuestros datos confirman varios estudios recientes en los que se ha señalado que los niveles de proteína GRP78/BIP y PDI disminuyen con la edad (Erickson *et al.*, 2006; Paz *et al.*, 2006).

Se ha señalado que la tendencia a acumular agregados de proteínas mal plegadas puede aumentar con la edad como consecuencia de una disminución de la capacidad de plegamiento (Nuss *et al.*, 2008). El RE es una de las dianas más importantes del estrés oxidativo (Tu y Weissman, 2004; Tu y Weissman, 2002) que parece modificar tanto a PDI como a GRP78/BIP, al menos en el hígado (Rabek *et al.*, 2003). En base a estos datos se ha postulado que uno de los factores que contribuyen al plegado incorrecto de las proteínas durante el envejecimiento es la pérdida de la actividad de tipo chaperona mediadas por GRP78/BIP y PDI (Nuss *et al.*, 2008). Nuestros datos proporcionan evidencias adicionales a esta hipótesis.

Efecto de la isquemia

Nuestros resultados de qPCR indican que 48 h después de la lesión aún aparece un aumento significativo en los niveles de transcritos de algunos genes relacionados con la UPR. Esto contrasta con el notable descenso descrito en los niveles de ARNm de muchos de los genes del sistema glutamatérgico y GABAérgico en un modelo similar de isquemia global (Dos Anjos *et al.*, 2009; Montori *et al.*, 2010a, b, c; Llorente *et al.*, 2013b). Estos datos muestran que la isquemia/reperfusión da lugar a un descenso en los niveles de transcripción tanto en los sistemas de

neurotransmisión excitador (glutamatérgico) como inhibidor (GABAérgico), pero produce un aumento en la expresión de los genes de la UPR. Este aumento parece reflejar una respuesta protectora al daño isquémico, ya que los ensayos con salubrinal, un promotor de la UPR que inhibe la desfosforilación de la eIF2 α , disminuyen significativamente el daño inducido por isquemia/reperfusión (Nakka *et al.*, 2010).

Se ha señalado que existe una estrecha correlación entre la UPR y la muerte celular retrasada. Esta correlación puede observarse en los estudios de preconditionamiento isquémico que impiden de forma muy efectiva la muerte celular retrasada (Kato *et al.* 1994; Shamloo *et al.*, 1999; Kirino, 1985) y disminuyen significativamente la cantidad de agregados proteicos (Liu *et al.*, 2005). Dicha correlación también se observa en el tratamiento post-isquémico basado en interrupciones mecánicas de la reperfusión donde también se observa una reducción del daño producido por la I/R, una disminución de la expresión de CHOP y caspasa 12 y consistentemente, un incremento en los niveles de GRP78/BIP (Yuan *et al.*, 2011). Nuestros resultados de ARNm también muestran esta correlación y además indican que la UPR y la muerte celular retrasada en el hipocampo son mayores que en la corteza cerebral, al menos 48 horas después de la I/R. Nuestros datos sugieren que la UPR puede superar el estrés de retículo en algunas áreas pero no en otras, lo que podría ser una clave para entender la vulnerabilidad diferencial a la isquemia en diferentes regiones encefálicas.

Algunos estudios previos de hibridación *in situ* en animales jóvenes sometidos a isquemia global han mostrado aumentos en los transcritos de varios genes que codifican chaperonas (GRP78/BIP, HERP y GRP94) después del daño isquémico. Estos estudios indican que el máximo incremento aparece 24 horas después de la isquemia y vuelve a la normalidad a las 48 horas (Truettner *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros datos de qPCR muestran que existe un incremento en los niveles de ARNm en todos los genes de UPR analizados, incluyendo CHOP (Tajiri *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2011). La relación entre CHOP y daño isquémico se ha descrito previamente. Así, ratones knock-out de CHOP presentan menor pérdida de neuronas después de la isquemia que los ratones silvestres en los modelos de 2VO (Tajiri *et al.*, 2004). En estudios de cultivos, las neuronas de ratones CHOP^{-/-} también mostraron mayor resistencia a la muerte inducida por hipoxia/reoxigenación (Tajiri *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la muerte celular retrasada asociada a la isquemia es inducida de forma predominante a través de la vía de señalización dependiente de CHOP en neuronas hipocampales (Osada *et al.*, 2010). CHOP puede promover la apoptosis en varios contextos y este efecto puede ser bloqueado por la sobreexpresión de GRP78/BIP, lo que indica que las vías de activación apoptótica mediadas por CHOP se disponen corriente abajo de la UPR (Boyce, 2006) por lo que no es sorprendente que la sobreexpresión de GRP78/BIP atenúe la inducción de la expresión de CHOP (Wang *et al.*, 1996). La transcripción y la traducción de CHOP representan una vía hacia la apoptosis cuando la UPR no se resuelve (De Gracia *et al.*, 2002). Nuestros datos estaría de acuerdo con esta hipótesis pero las variaciones en la respuesta a las 48 h de I/R no permiten discriminar si existe un efecto

retrasado en la expresión de CHOP como consecuencia de su localización corriente abajo de la respuesta a la UPR. Nuestros datos también sugieren que la expresión de CHOP y estrés de retículo están implicadas en diferencias en la vulnerabilidad neuronal en diferentes estructuras cerebrales. En este sentido, la respuesta de CHOP observada en nuestros datos es paralela a la observada en GRP78/BIP y GRP94 corroborando la respuesta diferencial entre la corteza cerebral y el hipocampo en animales isquémicos jóvenes.

En un modelo similar al empleado en este trabajo se ha señalado la presencia de estrés de retículo tras 1h de reperusión (Hu *et al.*, 2009; Truettner *et al.*, 2009) con aumentos en la expresión de varias chaperonas como HSP70, GRP78/BIP, PDI y GRP94 (Truettner *et al.*, 2009). Sin embargo, las distintas moléculas relacionadas con UPR presentan respuestas diferentes. Se ha señalado que algunas chaperonas (HSP70, GRP78/BIP, Hsp60, GRP94) aumentan progresivamente en el hipocampo en las primeras 24 h, mientras que los niveles de PDI permanecen sin cambios (Truettner *et al.*, 2009). Nuestros datos sobre la expresión de PDI en el hipocampo de los animales jóvenes son consistentes con los de Truettner *et al.*, (2009), y sugieren que los niveles de PDI no son modificados por la lesión isquémica en esta estructura. Sin embargo, las modificaciones en la expresión de PDI en la corteza cerebral indican una UPR diferente en el hipocampo y la corteza cerebral, lo que añade datos adicionales para explicar la respuesta diferencial a la isquemia entre estas estructuras.

Nuestros datos sobre la expresión GRP78/BIP en algunas estructuras en los animales jóvenes sometidos a lesión isquémica también son consistentes con el retorno a valores normales a las 24 h indicados previamente (Truettner *et al.*, 2009). Sin embargo, hemos detectado estructuras con aumentos en los niveles de GRP78/BIP inducidos por la isquemia, lo que indica que la UPR es aún detectable a nivel de proteínas 48 h después de la lesión. El diferente comportamiento en los niveles de PDI y GRP78/BIP entre animales jóvenes y viejos sometidos a I/R pone de manifiesto diferencias dependientes de la edad en UPR inducida por I/R y confirma que la UPR es detectable tanto en animales jóvenes como en viejos 48 h después de la lesión isquémica.

El tratamiento con meloxicam

Nuestros datos muestran que el tratamiento de meloxicam, a lo largo del tiempo de reperusión, disminuye la expresión de los genes relacionados con la UPR. Esta respuesta podría explicar por qué los animales de edad no sobrevivieron en un estudio previo al daño mediante I/R (Montori *et al.*, 2010a). Aunque son necesarios estudios más amplios con otros agentes antiinflamatorios, diferentes momentos en el tiempo y diferentes dosis, nuestros datos muestran que el tratamiento con meloxicam atenúa los incrementos de chaperonas tras el daño isquémico, sugiriendo que la reducción de la inflamación podría disminuir la capacidad de los animales para sobrevivir al proceso isquémico. En estudios preliminares hemos descrito que el meloxicam atenúa la respuesta transcripcional de un número de genes del sistema glutamatérgico 48 h después de la isquemia, incluyendo los genes que codifican las

subunidades GluR1 y GluR2 del receptor AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico) (Montori *et al.*, 2010b), las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (Montori *et al.*, 2010a), así como genes que codifican los transportadores de glutamato VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3, GLT1 (VGLUTs: transportadores de glutamato vesicular) y EAAC1 (transportador de aminoácidos excitatorios 1) (Montori *et al.*, 2010c; Llorente *et al.*, 2013a), mientras que el tratamiento con meloxicam actúa de una manera opuesta en el gen que codifica el transportador de glutamato GLAST-1a (transportador de glutamato/aspartato) (Llorente *et al.*, 2013a; Montori *et al.*, 2010a, b, c.). Varias subunidades del receptor GABA (por ejemplo $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$) también presentan una disminución en sus niveles de ARNm después de 48 h de I / R, y esta respuesta es bloqueada por el tratamiento de meloxicam (Montori *et al.*, 2010a).

Los marcadores microglial (CD11b) y astrogial (GFAP) son utilizados de forma generalizada como una medida del nivel de inflamación (Giovannoni, 2006; Hamby *et al.*, 2007; Kim y de Vellis, 2005; Massaro *et al.*, 1990; McGeer y McGeer, 1995; Yatsiv *et al.*, 2005). Utilizando tanto niveles de ARNm como técnicas inmunocitoquímicas para analizar estos marcadores se ha señalado que el tratamiento con meloxicam después de la lesión isquémica produce un efecto diferencial en el hipocampo y la corteza cerebral tras 48 horas de isquemia/reperfusión. Así, el tratamiento con meloxicam normaliza los niveles de estos marcadores inflamatorios en el hipocampo (es decir, los hace similares a los observados en los animales con operación simulada Sin embargo, en el CX los valores de estos marcadores siguen siendo significativamente mayores que en los

controles con operación simulada (Montori *et al.*, 2010a, b; Llorente *et al.*, 2013a). Es posible que existan diferencias en la respuesta inflamatoria entre el Hp y CX relacionadas con diferencias en el flujo sanguíneo en ambas estructuras. Nuestros datos de meloxicam parecen estar en contra de esta hipótesis ya que el tratamiento con meloxicam mantendría estas diferencias ya que no afectaría al flujo sanguíneo. Nuestros datos muestran que el tratamiento con meloxicam produce efectos similares en la respuesta de los genes de la UPR en el hipocampo y en el CX, disminuyendo en ambas estructuras mostrando el importante papel que juega la inflamación en la UPR.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La lesión isquémica aumenta la transcripción de los genes de la UPR en los animales jóvenes, en contraste con la disminución general de la actividad transcripcional o "parada transcripcional" descrita previamente en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico.
- La UPR parece capaz de superar el estrés de retículo en algunas áreas, como la corteza cerebral, pero no en otras, lo que puede explicar, al menos en parte, la vulnerabilidad diferencial entre la corteza cerebral y el hipocampo.
- La UPR parece estar fuertemente disminuida en animales de edad avanzada, lo que sugiere una menor capacidad para la supervivencia celular.
- La UPR puede ser atenuada mediante el uso de agentes antiinflamatorios tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- Ischemic injury increases the transcription of UPR-related genes in young animals, contrasting with the decreased transcription ("transcriptional stop") previously described in the glutamatergic and GABAergic systems.
- UPR seems able to sort out the reticulum stress in some brain areas, such as the cerebral cortex, but not in all of them. This could explain, at least partially, the differential vulnerability between the cerebral cortex and the hippocampus.
- UPR is strongly decreased in old animals suggesting a lesser ability of survival for cell survival.

UPR can be lessened by anti-inflammatory agents both in the cerebral cortex and the hippocampus.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Allen CL, Bayraktutan U. 2009. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4: 461-470.
- Aronowski J, Strong R, Grotta JC. 1997. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1048-1056.
- Ay H, Koroshetz WJ, Vangel M, Benner T, Melinosky C, Zhu M, Menezes N, Lopez CJ, et al. 2005. Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age. *Stroke* 36: 2632-2636.
- Baltan S, Besancon EF, Mbow B, Ye Z, Hamner MA Ransom BR. 2008. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity. *J Neurosci* 28: 1479-1489.
- Barnett HJ. 2002. Stroke prevention in the elderly. *Clin Exp Hypertens* 24: 563-571.
- Bendel O, Alkass K, Bueters T, von Euler M, von Euler G. 2005. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res* 1033:135-142.
- Berridge MJ. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32:235-349.

- Bourque S L, Adams M A, Nakatsu K, Winterborn A. 2010. Comparison of buprenorphine and meloxicam for postsurgical analgesia in rats: effects on body weight, locomotor activity, and hemodynamic parameters. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:617-622.
- Boyce M, Yuan J. 2006. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death and Differentiation* 13:363–373.
- Broderick JP. 2004. William M. feinberg lecture: Stroke therapy in the year 2025: Burden, breakthroughs, and barriers to progress. *Stroke* 35: 205-211.
- Brown AW, Marlowe KJ Bjelke B. 2003. Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. *Neurobiol Aging* 24: 607-614.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T Gotz M. 2008. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3581-3586.
- Candelario-Jalil E, Alvarez D, Castañeda JM, Al-Dalail SM, Martínez G, Merino N, León OS. 2002. The highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor DFU is neuroprotective when given several hours after transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 927:212-215.
- Cao Y, Mao X, Sun C, Zheng P, Gao J, Wang X, Min D, Sun H, Xie N, Cai J. 2011. Baicalin attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Brain Res Bull* 85:396-402.

- Cárdenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Castrillo A, Bodelón OG, Bosca L, Lizasoain I. 2000. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem* 74:2041-2048.
- Castilla-Guerra L, Balbuena GM, Fernández-Moreno MC. 2007. Statins in the secondary prevention of ictus in the community. *Aten Primaria* 39: 373-376.
- Chan JY, Cooney GJ, Biden TJ Laybutt DR. 2011. Differential regulation of adaptive and apoptotic unfolded protein response signalling by cytokine-induced nitric oxide production in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 54: 1766-1776.
- Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC, Blond SY. 2000. Interaction of Murine BiP/GRP78 with the DnaJ Homologue MTJ1. *J Biol Chem* 275:19620–19627.
- Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentim L, Rocha E, Salbego C. 2001. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett* 15:33-36.
- Coe H, Michalak M. 2009. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus: F96-F103.
- Collaço-Moraes Y, Aspey B, Harrison M, de Belleruche J. 1996. Cyclo-oxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J Cereb. Blood Flow Metab* 16:1366-1372.

- Corbett D, Hamilton M Colbourne F. 2000. Persistent neuroprotection with prolonged postischemic hypothermia in adult rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion. *Exp Neurol* 163: 200-206.
- Crompton M. 2000. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529:11–21.
- Cumlsee C, Krieglstein J. 2005. Mechanisms of neuronal degeneration after ischemic stroke—Emerging targets for novel therapeutic strategies. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2:463- 470.
- da Silva KP, Borges JC. 2011. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotrophic allosteric mechanism. *Protein Pept Lett* 18: 132-142.
- Danton GH, Dietrich WD. 2003. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:127-136.
- Dara L, Ji C, Kaplowitz N. 2011. The Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to Liver Disease. *Hepatology* 53:1752-1763.
- Daugaard M, Jaattela M Rohde M. 2005. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* 4: 877-880.
- Davies NM, Skjodt NM. 1999. Clinical pharmacokinetics of meloxicam. A cyclooxygenase-2 preferential nonsteroidal antiinflammatory drug. *Clin Pharmacokinet* 36:115-126.

- Davis M, Mendelow AD, Perry RH, Chambers IR James OF. 1995. Experimental stroke and neuroprotection in the aging rat brain. *Stroke* 26: 1072-1078.
- Degoute CS. 2007. Controlled hypotension: A guide to drug choice. *Drugs* 67: 1053-1076.
- De Gracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. 2002. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:127-134.
- Del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10:95-112.
- Dos-Anjos S, Martinez-Villayandre B, Montori S, Regueiro-Purrinos MM, Gonzalo-Orden JM Fernandez-Lopez A. 2009. Global ischemia-induced modifications in the expression of AMPA receptors and inflammation in rat brain. *Brain Res* 1287: 20-27.
- Dos-Anjos S, Martinez-Villayandre B, Montori S, Salas A, Perez-Garcia CC Fernandez-Lopez A. 2008. Quantitative gene expression analysis in a brain slice model: Influence of temperature and incubation media. *Anal Biochem* 378: 99-101.
- Doyle KP, Simon RP Stenzel-Poore MP. 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55: 310-318.

- Duarte SG, Campos AD Colli BO. 2003. Functional evaluation of temporary focal cerebral ischemia: Experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 61: 751-756.
- Eklöf B, Siesjö BK. 1972. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand* 86:155-165.
- Eletto D, Dersh D Argon Y. 2010. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 21: 479-485.
- Ellgaard L, Ruddock LW. 2005. The human protein disulphide isomerase family: Substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 6: 28-32.
- Erickson RR, Dunning LM, Holtzman JL. 2006. The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: the possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological seen with age. *J Gerontol* 61:435–443.
- Esiri MM. 2007. Ageing and the brain. *J Pathol* 211: 181-187.
- Ferrari DM, Soling HD. 1999. The protein disulphide-isomerase family: Unravelling a string of folds. *Biochem J* 339 (Pt 1): 1-10.
- Folbergrová J. 1993. Cerebral energy state of neonatal rats during seizures induced by homocysteine. *Physiol Res* 42:155-160.
- Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, et al. 2010. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic

reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 122: 361-369.

- Fu X, Zhu BT. 2009. Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is redox-regulated through formation of an inter-subunit disulfide bond. *Arch Biochem Biophys* 485: 1-9.
- Gao HM, Liu B, Zhang W Hong JS. 2003. Novel anti-inflammatory therapy for parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 24: 395-401.
- Gao XC, Zhou CJ, Zhou ZR, Wu M, Cao CY Hu HY. 2012. The C-terminal helices of heat shock protein 70 are essential for J-domain binding and ATPase activation. *J Biol Chem* 287: 6044-6052.
- Garcia L, Burda J, Hrehorovska M, Burda R, Martin ME, Salinas M. 2004. Ischaemic preconditioning in the rat brain: effect on the activity of several initiation factors, Akt and extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation, and GRP78 and GADD34 expression. *Journal of Neurochemistry* 88:136–147.
- Gass JN, Gunn KE, Sriburi R, Brewer JW. 2004. Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends in Immunology* 25:17-24.
- Gates BJ, Nguyen TT, Setter SM, Davies NM. 2005. Meloxicam: a reappraisal of pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother* 6:2117-2140.

- Gee CE, Benquet P, Raineteau O, Rietschin L, Kirbach SW, Gerber U. 2006. NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 23:2595–2603.
- Giovannoni G. 2006. Multiple sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers. *Dis Markers* 22:187-196.
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL Craik DJ. 2006. Protein disulfide isomerase: The structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci* 31: 455-464.
- Günther A, Küppers-Tiedt L, Schneider PM, Kunert I, Berrouschot J, Schneider D, Rossner S. 2005. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 21:3189-3194.
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK Chowdhuri DK. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sci* 86: 377-384.
- Gupta YK, Chauhan A. 2011. Potential of immunosuppressive agents in cerebral ischaemia. *Indian J Med Res* 133:15-26.
- Hamby AM, Suh SW, Kauppinen TM, Swanson RA. 2007. Use of a poly-(ADPribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemiareperfusion. *Stroke* 38:632-636.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum resident kinase. *Nature* 397: 271-274.

- Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH. 2005. Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 25:41–53.
- Hetz CA, Soto C. 2006. Stressing Out the ER: A Role of the Unfolded Protein Response in Prion-Related Disorders. *Curr Mol Med* 6:37–43.
- Hof PR, Morrison JH. 2004. The aging brain: Morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci* 27: 607-613.
- Holcik M, Sonenberg N. 2005. Translational Control in Stress and Apoptosis. *Nature* 6:318-327.
- Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego C. 2005. Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res* 30:355-361.
- Hu G, Suzuki T, Dong M, Shi QW, Cong B, Suzuki N. 2009. Luteolin increases the expression of GRP94 in HeLa cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2341-2344.
- Hussain SG, Ramaiah KV. 2007. Reduced eIF2 α phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochem Biophys Res Commun* 355:365-370.

- Iadecola C, Alexander M. 2001. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 14: 89-94.
- Iadecola C, Forster C, Nogawa S, Clark HB, Ross ME. 1999. Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 98:9-14.
- Imaoka S. 2011. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. *Int Rev Cell Mol Biol* 290: 121-166.
- Jablonska A, Lukomska B. 2011. Stroke induced brain changes: Implications for stem cell transplantation. *Acta Neurobiol Exp* 71:74-85.
- Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, Bowley SR, Joshi SS, et al. 2012. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest* 122: 2104-2113.
- Jiang X, Mu D, Manabat C, Koshy A, Christen S, Tauber MG, Vexler ZS, Ferriero DM. 2004. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen–glucose deprivation. *Exp Neurol* 190:224–232.
- Johnson JD, Fleshner M. 2006. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 79: 425-434.
- Kaneko M, Nomura Y. 2003. ER signaling in unfolded protein response. *Life Sciences* 74:199–205.

- Kass IS, Lipton P. 1982. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. *J Physiol* 332:459-472.
- Kato H, Kogure K, Araki T, Itoyama Y. 1994. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res* 664: 69-76.
- Kaufman RJ. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110:1389–1398.
- Ke Z, Wang X, Liu Y, Fan Z, Chen G, Xu M, Bowe KA, Jacqueline A, Frank JA, Li M, Fang S, Shi X, Jia Luo J. 2011. Ethanol Induces Endoplasmic Reticulum Stress in the Developing Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 35:1574–1583.
- Kim JY, Yenari MA. 2013. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol* 46: 1-7.
- Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302–313.
- Kim YJ, Yeu SY, Park BS, Koh HJ, Song JT, Seo HS. 2012. Protein disulfide isomerase-like protein 1-1 controls endosperm development through regulation of the amount and composition of seed proteins in rice. *PLoS One* 7: e44493.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. 1985. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia--reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res* 63:39-58.

- Kitamura M. 2009. Biphasic, bidirectional regulation of NF-kappaB by endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal* 11: 2353-2364.
- Kozlov G, Maattanen P, Thomas DY Gehring K. 2010. A structural overview of the PDI family of proteins. *Febs j* 277: 3924-3936.
- Krause GS, Tiffany BR. 1993. Suppression of protein synthesis in the reperfused brain. *Stroke* 24:747-755.
- Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, K Imaizumi, Takeda M. 2008. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Nature* 15:364–375.
- Kumar R, Krause GS, Yoshida H, Mori K, DeGracia DJ. 2003. Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23:462-471.
- Kumari Naga K, Panigrahi M, Prakash Babu P. 2007. Changes in endogenous antioxidant enzymes during cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol Res* 29:877-883.
- Lacoste A, De Cian MC, Cueff A Poulet SA. 2001. Noradrenaline and alpha-adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J Cell Sci* 114: 3557-3564.
- Lai E, Teodoro T Volchuk A. 2007. Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22: 193-201.

- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 17:87-97.
- Layfield R, Alban A, Mayer RJ, Lowe J. 2001. The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:171-179.
- Lee AS. 2007. GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 67: 3496-3499.
- Li J, Lee AS. 2006. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 6: 45-54.
- Li J, Soroka J, Buchner J. 2012. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim Biophys Acta* 1823: 624-635.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151-1191.
- Little E, Tocco G, Baudry M, Lee AS, Schreiber SS. 1996. Induction of Glucose-Regulated Protein (Glucose-Regulated Protein 78/BiP and Glucose-Regulated Protein 94) and Heat Shock Protein 70 Transcriptis in the Immature Rat Brain Followings Status Epilepticus. *Neuroscience* 75: 209–219.
- Liu CL, Ge P, Zhang F, Hu BR. 2005. Co-translational protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neuroscience* 134:1273-1284.
- Liu Y, Gampert L, Nething K, Steinacker JM. 2006. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front Biosci* 11: 2802-2827.

- Llorente IL, Perez-Rodriguez D, Burgin TC, Gonzalo-Orden, JM, Martinez-Villayandre B, Fernandez-Lopez A. 2013a. Age and meloxicam modify the response of the glutamate vesicular transporters (VGLUTs) after transient global cerebral ischemia in the rat brain. *Brain Res Bull* 94: 90-97.
- Llorente IL, Perez-Rodriguez D, Martinez-Villayandre B, Dos-Anjos S, Darlison MG, Poole AV Fernandez-Lopez A. 2013b. GABA(A) receptor chloride channels are involved in the neuroprotective role of GABA following oxygen and glucose deprivation in the rat cerebral cortex but not in the hippocampus. *Brain Res* 1533: 141-151.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399-415.
- Lobner D, Lipton P. 1993. Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during in vitro ischemia:relationship to electrophysiological cell damage. *J Neurosci* 13:4861-4871.
- Lodish HF, Kong N, Wikström L. 1992. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267:12753-12760.
- Lynch G, Rex CS, Gall CM. 2006. Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Res Rev* 5:255-280.
- Macario AJ, Conway de Macario E. 2002. Sick chaperones and ageing: a perspective. *Ageing Res Rev* 1:295-311.

- Malhi H, Kaufman RJ. 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of Hepatology* 54:795–809.
- Mansilla MJ, Montalban X Espejo C. 2012. Heat shock protein 70: Roles in multiple sclerosis. *Mol Med* 18: 1018-1028.
- Markus TM, Tsai SY, Bollnow MR, Farrer RG, O'Brien TE, Kindler-Baumann DR, Rausch M, Rudin M, et al. 2005. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol* 58: 950-953.
- Marzec M, Eletto D Argon Y. 2012. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1823: 774-787.
- Massaro AR, Scivoletto G, Tonali P. 1990. Cerebrospinal fluid markers in neurological disorders. *Ital J Neurol Sci* 11:537-547.
- Matsushita E, Asai N, Enomoto A, Kawamoto Y, Kato T, Mii S, Maeda K, Shibata R, et al. 2011. Protective role of gipie, a girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 22: 736-747.
- Maytin EV, Ubeda M, Lin JC Habener JF. 2001. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp Cell Res* 267: 193-204.

- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY Holbrook NJ. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21: 1249-1259.
- McGeer PL, McGeer EG. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 21:195– 218.
- Meyer TN, da Silva AL. 1999. Cell response to stress. *Rev Assoc Med Bras* 45: 181-188.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Närhi M, Hökfelt T, Koistinaho J. 1997. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci* 94: 6500-6505.
- Montori S, Dos-Anjos S, Martinez-Villayandre B, Regueiro-Purrinos MM, Gonzalo-Orden JM, Ruano D, Fernandez-Lopez A. 2010a. Age and meloxicam attenuate the ischemia/reperfusion-induced down-regulation in the NMDA receptor genes. *Neurochem Inst* 56:878-885.
- Montori S, Dos-Anjos S, Poole A, Regueiro-Purrinos MM, Darlison MG, Fernandez-Lopez A, Martinez-Villayandre B. 2012. Differential effect of transient global ischemia on the levels of GABAA receptor subunit mRNAs in young and older rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38:710-722.

- Montori S, Dos-Anjos S, Rios-Granja MA, Perez-Garcia CC, Fernandez-Lopez A, Martinez-Villayandre B. 2010b. AMPA receptor down-regulation induced by ischemia/reperfusion is attenuated by age and blocked by meloxicam. *Neuropathol Applied Neurobiol* 36:436-447.
- Montori S, Martinez-Villayandre B, Dos-Anjos S, Llorente IL, Burgin TC, Fernandez-Lopez A. 2010c. Age-dependent modifications in the mRNA levels of the rat excitatory amino acid transporters (EAATs) at 48 hour reperfusion following global ischemia. *Brain Res* 1358:11-19.
- Morito D, Nagata K. 2012. ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases. *Front Immunol* 3: 48.
- Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 39:1291-1304.
- Morra G, Potestio R, Micheletti C Colombo G. 2012. Corresponding functional dynamics across the Hsp90 chaperone family: Insights from a multiscale analysis of MD simulations. *PLoS Comput Biol* 8: e1002433.
- Mukherjee A, Soto C. 2011. Role of calcineurin in neurodegeneration produced by misfolded proteins and endoplasmic reticulum stress. *Curr Opin Cell Biol* 23:223-230.

- Muntner P, Garrett E, Klag MJ, Coresh J. 2002. Trends in stroke prevalence between 1973 and 1991 in the US population 25 to 74 years of age. *Stroke* 33: 1209-1213.
- Naidoo N, Ferber M, Master M, Zhu Y, Pack AI. 2008. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J Neurosci* 28:6539-6548.
- Nakamura T, Lipton SA. 2011. S-nitrosylation of critical protein thiols mediates protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 14: 1479-1492.
- Nakka VP, Gusain A, Raghubir R. 2010. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res* 17: 189-202.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Netto CA, Hodges H, Sinden JD, Le Peillet E, Kershaw T, Sowinski P, Meldrum BS, Gray JA. 1993. Foetal grafts from hippocampal region superior alleviate ischaemic-induced behavioural deficits. *Behav Brain Res* 58:107-112.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17:2746-2755.

- Nuss JE, Choksi KB, DeFord JH, Papaconstantinou J. 2008. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun* 365:355-361.
- Onténiente B, Couriaud C, Braudeau J, Benchoua A, Guégan C. 2003. The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspases therapy. *Biochemical Pharmacology* 66:1643-1649.
- O'Rourke B. 2003. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol* 1:23-36.
- Osada N, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. 2010. Characterization of neuronal and astroglial responses to ER stress in the hippocampal CA1 area in mice following transient forebrain ischemia. *Neurochem Int* 57:1-7.
- Oyadomari S, Mori M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation* 11:381–389.
- Paschen W, Mengesdorf T. 2005. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409–415.
- Paz GM, Vela J, Castano A, Ramos B, del Rio JC, Vitorica J, Ruano D. 2006. Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 27:973–982.
- Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.

- Petcu EB, Sfredel V, Platt D, Herndon JG, Kessler C Popa-Wagner A. 2008. Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: A mini-review. *Gerontology* 54: 6-17.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Popa-Wagner A, Schroder E, Walker LC Kessler C. 1998. Beta-amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: Effect of age. *Stroke* 29: 2196-2202.
- Pozzo-Miller LD, Pivovarova NB, Leapman RD, Buchanan RA, Reese TS, Andrews SB. 1997. Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices. *J. Neurosci* 17:8729-8738.
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutierrez A, Simal-Hernandez P, Pascual-Garvi JM, Matias-Guiu J, Roda JM Barcia-Albacar JA. 2008. Experimental models of cerebral ischemia. *Rev Neurol* 47: 414-426.
- Pringle AK, Thomas SJ, Signorelli F, Iannotti F. 1999. Ischaemic preconditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res* 845:152-164.
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, et al. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein bim. *Cell* 129: 1337-1349.

- Qi R, Sarbeng EB, Liu Q, Le KQ, Xu X, Xu H, Yang J, Wong JL, et al. 2013. Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat Struct Mol Biol* 20: 900-907.
- Rabek JP, Boylston III, WH, Papaconstantinou J. 2003. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver *Biochem. Biophys. Res. Commun* 305: 566–572
- Rasheva VI, Domingos PM. 2009. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14: 996-1007.
- Rattan SI, Clark BF. 2005. Understanding and modulating ageing. *IUBMB Life* 57: 297-304.
- Reith ME, Zimanyi I O'Reilly CA. 1989. Role of ions and membrane potential in uptake of serotonin into plasma membrane vesicles from mouse brain. *Biochem Pharmacol* 38: 2091-2097.
- Rink C, Khanna S. 2011. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid Redox Signal* 14: 1889-1903.
- Ritosa FM. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
- Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF. 2011. Aging genetics and aging. *Aging Dis* 2:186-195.

- Roller C, Maddalo D. 2013. The molecular chaperone GRP78/BiP in the development of chemoresistance: Mechanism and possible treatment. *Front Pharmacol* 4: 10.
- Romisch K. 2006. Cdc48p is UBX-linked to ER ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci* 31: 24-25.
- Ron D, Habener JF. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6: 439-453.
- Ron D, Walter P. 2007. Signal integration in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:519-529.
- Rutkevich LA, Cohen-Doyle MF, Brockmeier U Williams DB. 2010. Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Mol Biol Cell* 21: 3093-3105.
- Sairanen T, Ristimäki A, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Kaste M, Lindsberg PJ. 1998. Cyclooxygenase 2 is induced globally in infarcted human brain. *Ann Neuro* 43:738-747.
- Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H. 2011. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci* 34:3-11.

- Sanders BM, Martin LS. 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci Total Environ* 139-140: 459-470.
- Santos BC. 2001. Atualização em insuficiência renal aguda: Resposta celular ao estresse na insuficiência renal aguda. *J Bras Nefrol* 23(1):64-7.
- Schaller BJ. 2007. Influence of age on stroke and preconditioning-induced ischemic tolerance in the brain. *Exp Neurol* 205: 9-19.
- Scheuner D, Kaufman RJ. 2008. The Unfolded Protein Response: A Pathway That Links Insulin Demand with β -Cell Failure and Diabetes. *Endocrine Reviews* 29:317–333.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183:25-33.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40:599-636.
- Schroder M, Kaufman RJ. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.
- Schurr A, Dong WQ, Reid KH, West CA, Rigor BM. 1988. Lactic acidosis and recovery of neuronal function following cerebral hypoxia in vitro. *Brain Res* 438:311-314.

- Scull CM, Tabas I. 2011. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2792-2797.
- Seo H-Y, Kim YD, Lee KM, Min AK, Kim MK, Kim HS, Won KC, Park JY, Lee KU, Cho HS, Park KG, Lee IK. 2008. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Activation of Activating Transcription Factor 6 Decreases Insulin Gene Expression via Up-Regulation of Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner. *Endocrinology* 149:3832–3841.
- Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB Wolf PA. 2006. The lifetime risk of stroke: Estimates from the framingham study. *Stroke* 37: 345-350.
- Shamloo M, Rytter A, Wieloch T. 1999. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 93:81-88.
- Shinkai Y, Yamamoto C, Kaji T. 2010. Lead Induces the Expression of Endoplasmic Reticulum Chaperones GRP78 and GRP94 in Vascular Endothelial Cells via the JNK-AP-1 Pathway. *Toxicological Sciences* 114:378–386.
- Shukla HD, Pitha PM. 2012. Role of hsp90 in systemic lupus erythematosus and its clinical relevance. *Autoimmune Dis* 2012: 728605.
- Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5: 146-156.

- Sitia R, Braakman I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426:891-894.
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosén I, Wieloch T, Siesjö SK. 1984. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69:385-401.
- Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. 2004. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562: 11-15.
- Stanika RI, Winters CA, Pivovarova NB, Andrews SB. 2010. Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs. CA3 hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 37:403–411.
- Stoffels B, Yonezawa K, Yamamoto Y, Schäfer N, Overhaus M, Klinge U, Kalff JC, Minor T, Tolba RH. 2011. Meloxicam, a COX-2 inhibitor, ameliorates ischemia/reperfusion injury in non-heart-beating donor livers. *Eur Surg Res* 47:109-117.
- Stolf BS, Smyrniak I, Lopes LR, Vendramin A, Goto H, Laurindo FR, Shah AM, Santos CX. 2011. Protein disulfide isomerase and host-pathogen interaction. *Scientificworldjournal* 11: 1749-1761.
- Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G. 2000. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2264-2269.

- Sutherland GR, Dix GA Auer RN. 1996. Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke* 27: 1663-7; discussion 1668.
- Suzuki K, Masawa N, Sakata N Takatama M. 2003. Pathologic evidence of microvascular rarefaction in the brain of renal hypertensive rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 12: 8-16.
- Tabas I, Ron D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13: 184-190.
- Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI, Ushio Y Mori M. 2004. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 11: 403-415.
- Tang D, Kang R, Xiao W, Wang H, Calderwood SK Xiao X. 2007. The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *J Immunol* 179: 1236-1244.
- Taoufik E, Probert L. 2008. Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des* 14: 3565-3573.
- Tavares A., Cimarosti H., Valentim L., Salbego C. (2001) Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport*. 12:2705-2709.

- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. 2010. A practical approach to RT-qPCR-publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50: S1-5.
- Tian G, Xiang S, Noiva R, Lennarz WJ, Schindelin H. 2006. The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell* 124: 61-73.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398.
- Truettner JS, Hu K, Liu CL, Dietrich WD, Hu B. 2009. Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. *Brain Res* 1249:9-18.
- Tu BP, Weissman JS. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164: 341-346.
- Tu BP, Weissman JS. 2002. The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10: 983-994.
- Udono H. 2012. Heat shock protein and antigen cross-presentation. *Seikagaku* 84: 829-839.
- Valentim LM, Michalowski CB, Gottardo SP, Pedroso L, Gestrich LG, Netto CA, Salbego CG, Rodnight R. 1999. Effects of transient cerebral ischemia on glial

fibrillary acidic protein phosphorylation and immunocontent in rat hippocampus. *Neuroscience* 91:1291-1297.

- Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG. 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118:379-386.
- Vallet PG, Charpiot A. 1994. Cerebral hippocampic ischemia, metabolic disorders and neuronal death. *Encephale* 20:131-137.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- Vellai T. 2009. Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ* 16: 94-102.
- Vembar SS, Brodsky JL. 2008. One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 944-957.
- Wanderling S, Simen BB, Ostrovsky O, Ahmed NT, Vogen SM, Gidalevitz T, Argon Y. 2007. GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Mol Biol Cell* 18: 3764-3775.
- Wang LC, Futrell N, Wang DZ, Chen FJ, Zhai QH, Schultz LR. 1995. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats. *Stroke* 26: 2087-2090.

- Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, et al. 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* 16: 4273-4280.
- Wegele H, Muller L, Buchner J. 2004. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1-44.
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. 2000. Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179:1-33.
- Whittingham TS, Lust WD, Christakis DA, Passonneau JV. 1984. Metabolic stability of hippocampal slice preparations during prolonged incubation. *J Neurochem* 43:689-696.
- Wu J, Kaufman RJ. 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Nature* 13:374–384.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed CJ. 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656–2664.
- Xu ZS, Li ZY, Chen Y, Chen M, Li LC, Ma YZ. 2012. Heat shock protein 90 in plants: Molecular mechanisms and roles in stress responses. *Int J Mol Sci* 13: 15706-15723.
- Yankner BA, Lu T, Loerch P. 2008. The aging brain. *Annu Rev Pathol* 3: 41-66.

- Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsenter J, Shohami E. 2005. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 19:1701–1703.
- Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci* 96:13496-13500.
- Yuan Y, Guo Q, Ye Z, Pingping X, Wang N, Song Z. 2011. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res* 1367:85-93.
- Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, Majid A. 2004. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: An overview. *Neurotoxicology* 25: 895-904.
- Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH. 1994. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 125: 3-10.