

# Respuesta de la mitocondria en un modelo de isquemia cerebral focal en rata

Villafuerte-Morquecho Luis Enrique <sup>1,2</sup>, Orozco-Ibarra Marisol <sup>3</sup>, Corzo-Toledo Jorge Daniel <sup>4,5</sup>, Cázares-Raga Febe Elena <sup>5</sup>, Hernández-Hernández Fidel de la Cruz <sup>5</sup>, Ortiz-Plata Alma <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Ciudad de México.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Ciudad de México.

<sup>4</sup>Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México.

<sup>5</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

\*Correspondencia: Dra. Alma Ortiz Plata. Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, Delegación Tlalpan 14269, Ciudad de México, México. Email: aortizplata@yahoo.com.mx

## Resumen

**Antecedente:** la mitocondria se daña en la isquemia cerebral focal (ICF). Dada su participación en la producción de ATP y los procesos de muerte celular, es relevante caracterizar el proceso de daño.

**Objetivo:** evidenciar el daño tisular y los cambios en el perfil proteómico mitocondrial del cuerpo estriado e hipocampo en la ICF.

**Material y métodos:** en ratas Wistar macho, se indujo ICF por 15' o 1h, y se obtuvieron muestras de inmediato o a las 24 h de reperusión (rpf). Se realizó valoración neurológica, análisis histológico y análisis proteómico mitocondrial.

**Resultados:** se presentó déficit neurológico a partir de los 15' de ICF. Consistentemente, se detectó daño tisular mediante H&E; además, se encontró muerte celular a 1h-ICF/rpf mediante la tinción de TTC. En el perfil proteómico se observaron 20 puntos candidato de proteínas, de los cuales, varios mostraron cambios cualitativos (seis en estriado y cuatro en hipocampo) a partir de los 15' de ICF en comparación con el control. Dos de estos puntos mostraron claro aumento en su expresión en ambas regiones.

**Conclusión:** con este estudio se muestra que desde los primeros minutos del evento isquémico la mitocondria sufre cambios en la expresión de proteínas como respuesta al daño producido por la ICF. La identificación y caracterización de las proteínas que se alteran permitirá estudiar con mayor profundidad los procesos bioquímicos que se presentan ante la ICF, lo cual contribuirá a ampliar el conocimiento básico de la secuencia de eventos que se dan como respuesta a la ICF.

**Palabras clave:** *isquemia Cerebral, proteómica, reperusión, mitocondria, expresión diferencial.*

Recepción  
05 /09 / 2017

Aceptado  
19 /12/ 2017

# Mitochondrial response in the rat focal cerebral ischemia

## Abstract

**Antecedents:** focal cerebral ischemia (FCI) causes mitochondrial injury. Due to its participation in ATP production and in cell death processes, it is important to characterize the damage.

**Objective:** To show the tissue injury and mitochondrial proteomic profile changes in striatum and hippocampus in FCI.

**Material and methods:** Fifteen min and 1h of FCI with and without 24h of sanguineous reperfusion (rpf) was induced in Male Wistar rats. Neurological evaluation, histological assessment and mitochondrial proteomic analysis was done.

**Results:** Neurological deficit was observed from the 15 min of FCI. Tissue damage was observed with H&E stain; TTC stain show macroscopic cellular death at 1h-FCI/24h rpf. By proteomic strategy, 20 protein spots were initially found to be differentially expressed; 6 spots in striatum and 4 spots in hippocampus show qualitative differences, of these spots, two protein spots show evident changes from 15 min of FCI, in both cerebral regions.

**Conclusion:** focal cerebral ischemia induces mitochondrial protein expression changes from the first minutes of the ischemic insult, as were observed by proteomic strategy. The subsequent identification and characterization of these proteins will allow studying the biochemical processes that take place in FCI, and will contribute to broaden the knowledge of the sequence of events that occur in response to ischemia.

**Key words:** cerebral ischemia, proteomics, reperfusion, mitochondria, differential expression.

## Introducción

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es una alteración neurológica producida por un proceso patológico de los vasos sanguíneos, que afecta un área del encéfalo de forma súbita, transitoria o permanente, ya sea por isquemia, definida como la carencia de oxígeno y glucosa en el tejido cerebral, o por hemorragia<sup>1</sup>. La isquemia cerebral (IC) representa el 80% de las enfermedades cerebrovasculares, las cuales constituyen la primera causa de discapacidad,

la segunda de demencia y la tercera de muerte en los países industrializados<sup>2,3,4,5</sup>. En México, la EVC representa la tercera causa de muerte en personas mayores de 65 años<sup>6,7</sup>. Por sus consecuencias sobre la salud y su consecuente impacto económico y social, es necesario investigar los procesos fisiológicos y moleculares que se desencadenan, para desarrollar estrategias de protección, tratamiento y prevención.

El cerebro demanda gran cantidad de ATP para mantener su integridad funcional, y la obtiene de la glucólisis aerobia y de la reducción del oxígeno en la mitocondria<sup>8</sup>. Este proceso es afectado por la IC debido a la interrupción del flujo sanguíneo. Se ha propuesto que las proteínas mitocondriales juegan un papel importante en el daño isquémico<sup>9</sup>, por lo que en el presente trabajo se evaluó el daño tisular y el perfil proteómico mitocondrial del cuerpo estriado e hipocampo, empleando un modelo de isquemia cerebral focal (ICF) en rata.

## **Material y Métodos**

### **Modelo de Isquemia Cerebral Focal**

Se indujo ICF del hemisferio izquierdo a ratas Wistar macho (280-300 g) por oclusión de la arteria cerebral media<sup>10</sup> durante 15', 1 h con y sin 24 h de reperusión (rpf). Como control normal se usaron ratas sham (solo con manipulación quirúrgica). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del INNN y se apegaron a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas se sacrificaron por sobredosis intracardiaca de anestésico (pentobarbital sódico, laboratorios PiSA, Guadalajara, Jal. México).

### **Valoración Neurológica**

Se evaluó el daño neurológico de acuerdo a la escala de Capdeville<sup>11</sup>, que consiste en valorar: disminución o ausencia de movimiento espontaneo cuando la rata es colocada sobre una superficie, flexión de la extremidad anterior derecha, giros hacia la derecha e incapacidad de sostenerse de una cuerda.

### **Análisis Histológico**

Para visualizar macroscópicamente el daño tisular se empleó TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium hydrochloride), el cual es un indicador redox de

la respiración celular<sup>12</sup>. Se elaboraron cortes coronales en fresco de 2 mm de grosor y se incubaron con TTC al 2% en solución salina por 30 min a 37°C. Posteriormente estos mismos tejidos fueron deshidratados en alcoholes graduales e incluidos en parafina. Cortes de 4 µm se tiñeron con de Hematoxilina y Eosina (H-E) y se observaron al microscopio (Nikon E200).

### **Extracción de proteínas**

Se aisló la fracción mitocondrial del cuerpo estriado y el hipocampo del hemisferio izquierdo mediante un método previamente reportado<sup>13</sup>. El botón mitocondrial se suspendió en 200 µl de amortiguador de lisis (Urea 8M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, IPG 2%, DTT 50mM, EDTA 1nM, EGTA 1mM) con inhibidores de proteasas (Complete mini, ROCHE) y fosfatasa (PhosStop, ROCHE), se congeló en nitrógeno líquido y fue homogenizado. Después, las proteínas mitocondriales se precipitaron con ácido tricloroacético (SIGMA-ALDRICH) al 77% en acetona incubando a -20°C por 30 min. Se centrifugó a 15,000 x g por 15 min a 4°C y el botón se lavó tres veces con 400 µl de acetona fría (5 min), se centrifugó a 4°C y se secó por 3 min a temperatura ambiente. Las proteínas se resuspendieron en 150 µl de amortiguador de hidratación (DeStreak™ Rehydration Solution, GE Heath Care) con los mismos inhibidores, conteniendo IPG buffer pH 3-10, al 0.5% (Biorad) y se cuantificaron mediante un estuche comercial (2D Quant Kit, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Análisis de Perfil Proteómico**

Se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional<sup>14</sup>. Para esto, tiras pre-hechas (ReadyStrip IPG Strips, Biorad 163-2000) de 7 cm pH 3-10, se hidrataron toda la noche a temperatura ambiente con 40 µg de proteína en 150 µl de de amortiguador de hidratación

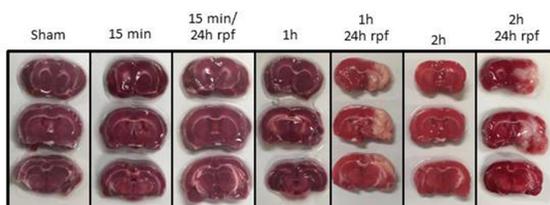
y se sometieron a isoelectroenfoque (IEF) en una cámara Protean IEF Cell (Biorad). La segunda dimensión se corrió en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% a 200 mV por 40 min. Los geles se fijaron por 30 min en una mezcla de etanol absoluto 30%/ácido acético 10%, se tiñeron con azul de coomassie por 1 h y se lavaron con agua MQ. La digitalización y análisis de los geles 2DE se realizó con un equipo Fusion Solo S, Vilber Loumant.

## Resultados

### Análisis histológico

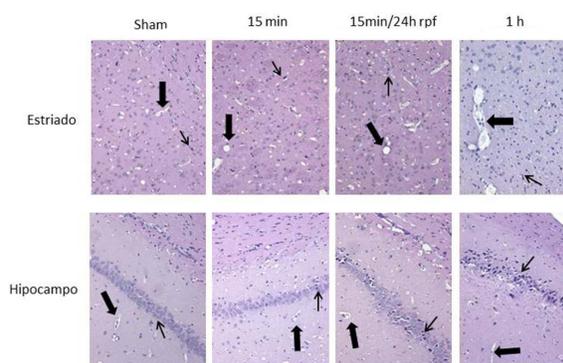
La tinción de TTC evidenció el daño al parénquima cerebral mostrando una zona incolora solo en el grupo de 1hICF/24h rpf. En los grupos con 15' y 15'/24h rpf y 1 h no se evidenció el mediante esta técnica. Con el fin de evaluar el modelo experimental, se indujo ICF por 2h y 2h/24h-rpf, mostrando cambios macroscópicos marcados en la rpf (figura 1).

Los cortes teñidos con H-E mostraron el daño producido por la ICF a los 15', 15'/24h rpf y 1h, que no fue evidenciado con la tinción de TTC.



**Figura 1.** Cortes coronales de cerebro de rata a la altura del estriado e hipocampo, de los diferentes grupos experimentales teñidos con TTC. El daño producido por la ICF/rpf se observa como una zona incolora en el parénquima cerebral.

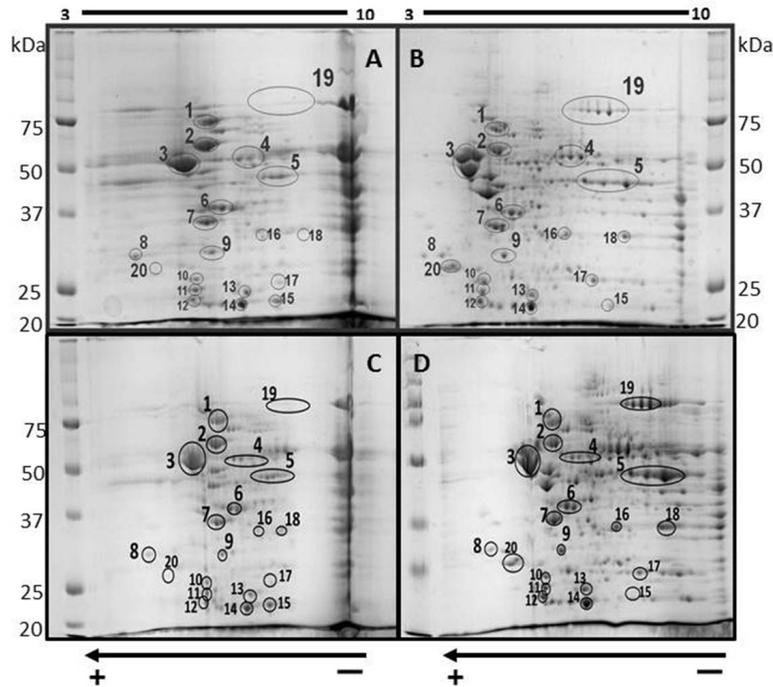
En estos grupos se observaron alteraciones en el neurópilo con dilataciones de las prolongaciones membranales, edema celular (citotóxico), edema de los vasos (vasogénico) y células picnóticas, producto del encogimiento del cuerpo celular y condensación de su contenido (figura 2).



**Figura 2.** Cortes coronales de cerebro de rata de 4 µm de grosor teñidos con hematoxilina y eosina. En el grupo sham se muestran neuronas (flecha fina) y vasos (flecha gruesa) conservados en ambas regiones cerebrales; En los grupos con ischemia (15 min, 15 min/24hrpf y 1h) se observó edema citotóxico, neuronas con núcleo picnótico (flechas finas) y edema vasogénico (flechas gruesas). Aumento X10.

### Perfil proteómico

En los geles 2DE de las dos regiones cerebrales analizadas, se observaron 20 puntos candidato de proteína con posibles diferencias en su intensidad, comparando con el grupo sham; de estos, fueron seleccionados seis puntos en estriado y cuatro puntos en hipocampo, cuyas diferencias fueron más constantes y marcadas, en los grupos con reperusión (figura 3). Dos de estos puntos (19 y 20) mostraron un claro aumento de expresión en ambas regiones cerebrales, en condiciones de reperusión.



**Figura 3.** Geles 2DE teñidos con azul de Coomassie. Se muestran 20 puntos candidato de proteína en ambas regiones cerebrales. A) Estriado Control; B) Estriado 15 min ICF/24h rpf; C) Hipocampo Control; D) Hipocampo 15 min ICF/24h rpf. En el cuerpo estriado se observan diferencias de intensidad en los puntos 5, 7, 9, 10, 19 y 20 y en el hipocampo destacaron 4 puntos: 5, 9, 19 y 20, en comparación con el control.

### Discusión

La isquemia cerebral es uno de los padecimientos con mayor incidencia en el mundo, produce discapacidad y muerte, con un alto costo económico<sup>15</sup>. El modelo experimental de ICF en rata reproduce las alteraciones neurológicas que se presentan en el humano, haciendo posible su análisis histológico y molecular<sup>16</sup>. Las alteraciones tisulares producidas por la ICF se pueden observar macroscópicamente mediante la tinción de TTC, sin embargo

en este trabajo, el TTC solo evidenció el daño producido por tiempos largos de isquemia y en condiciones de reperusión, es decir, al establecerse el infarto. Por lo tanto, para la evaluación de la ICF en este modelo experimental, es necesario realizar el análisis histológico en cortes de tejido teñido con H-E, sumado a la evaluación neurológica, con el fin de dar una mayor confiabilidad al modelo y al material empleado para las diferentes técnicas de análisis.

La estrategia proteómica permite analizar la expresión de proteínas en fenómenos complejos como la IC, y conocer sus cambios dependiendo del estado fisiológico o patológico en que se encuentre el organismo<sup>17</sup>. La mitocondria es un organelo fundamental para la producción de ATP en la célula<sup>18</sup> y es severamente afectada en la IC. Con esta estrategia se analizaron los cambios en el patrón de expresión de proteínas mitocondriales en estriado e hipocampo a tiempos cortos de ICF y se seleccionaron puntos con diferencias en su expresión.

### Conclusión

Con este estudio se muestra que la mitocondria sufre cambios en la expresión de proteínas como respuesta al daño producido por la ICF y que estos cambios se presentan desde los primeros minutos del evento isquémico. La identificación y caracterización de las proteínas seleccionadas, permitirá averiguar las vías moleculares en las que estas

participan, contribuyendo al conocimiento básico de la secuencia de eventos que se dan como respuesta a la isquemia cerebral focal.

### Financiamiento

Este proyecto es apoyado por el CONACyT #156906. Los materiales y reactivos usados en la obtención de la fracción mitocondrial fueron obtenidos mediante el proyecto No. 168356-MOI. El equipo empleado para la digitalización y análisis de los geles 2DE (Fusion Solo S, Vilber Loumant) fue adquirido por la Dra. Francisca Pérez Severiano, F.P-S 241911. El foto microscopio Nikon E200 fue adquirido por apoyo del CONACyT #226201.

### Agradecimientos

Al MVZ Rodolfo Pérez Madrigal y al M.Sc. Cesar Rodríguez del Departamento de Bioterio, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por el suministro de los animales usados.

### Referencias

1. Diez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Rev Neurol 2001; 33(5):455-464.
2. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of a mayor experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol, Biochem and Behavior 2007; 87(1):179-197.
3. Cheatwood JL, Emerick AJ, Kartje GL. Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke. Top Stroke Rehabil 2008; 15(1):42-50.
4. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci 1999; 22(9):391-7.
5. Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. Stroke 2011; 42(2): 517-84.
6. Cantú-Brito C, Mimenza-Alvaeado A, Sánchez-Hernández JS. Diabetes mellitus and aging as a risk factor for cerebral vascular disease: Epidemiology, pathophysiology and prevention. Rev Invest Clin 2010;62(4):333-42.

7. Deitzelzweig SB, Ogbonnaya A, Berenson K, Lamerato LE, Costas JP, Makenbaeva D, Corbelli J. Prevalence of stroke/transient ischemic attack among patients with acute coronary syndromes in a real-world setting. *Hosp Pract (Minneapolis)* 2010; 38(4):7-17.
8. Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, Okami N, Chan PH. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(1):92-9.
9. Hu Y, Deng H, Xu S, Zhang J. MicroRNAs regulate mitochondrial function in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Sci* 2015; 16(10):24895-917.
10. Longa ZE, Weinstein PR, Carlson S and Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in Rats. *Stroke* 1999; 20(1):84-911.
11. Capdeville Ch, Pruneau D, Allix, Plotkine M, Boulu R. G. Naloxone effect on the neurological deficit induced by forebrain ischemia in rats. *Life Sci* 1986; 38:437-442.
12. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986;17(6):1304-8.
13. Luis-García ER, Limón-Pacheco JH, Serrano-García N, Hernández-Pérez AD, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Ibarra M. Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. *J Biochem Mol Toxicol* 2017; 31(2). doi: 10.1002/jbt.21837.
14. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R and Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21(6):1037-53.
15. Broussalis E, Killer M, McCoy M, Harrer A, Trinka E, Kraus J. Current therapies in ischemic stroke. Part A. Recent developments in acute stroke treatment and in stroke prevention. *Drug Discov Today* 2012; 17(7-8):296-309.
16. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 2010; 29:67(2):181-98.
17. Gauss C, Kalkum1 M, Löwe M, Lehrach H, Klose J. Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic. *Electrophoresis* 1999; 20(3):575-600.
18. Lu FH, Tian Z, Zhang WH, Zhao YJ, Li HL, Ren H, Zheng HS, Liu C, Hu GX, Tian Y, Yang BF, Wang R, Xu CQ. Calcium-sensing receptors regulate cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> signaling via the sarcoplasmic reticulum-mitochondrion interface during hypoxia/reoxygenation. *J Biomed Sci* 2010; 17(1):1-11.

---

Artículo sin conflicto de interés

---

© Archivos de Neurociencias