



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN GENÉTICA EVOLUTIVA

Expresión de genes vinculados con la hipoxia y el
daño oxidativo tras asfixia perinatal, y en
respuesta a un tratamiento neuroprotector con
quercetina

TESINA DE GRADO
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

VIVIANA CARDOZO

ORIENTADORA: GABRIELA BEDÓ
CO-ORIENTADORA: FERNANDA BLASINA



Julio 2014

Tabla de Contenido

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
LA HIPOXIA EN EL RECIÉN NACIDO	5
EL DAÑO HIPÓXICO A NIVEL MOLECULAR	6
<i>Falla energética y Acidosis.....</i>	7
<i>Excitotoxicidad.....</i>	8
<i>Aumento del calcio intracelular.....</i>	9
<i>Estrés oxidativo.....</i>	9
ESTADO ACTUAL DE LA ATENCIÓN AL RECIÉN NACIDO ASFÍCTICO	10
EL CERDO COMO MODELO ANIMAL.....	12
LOS FLAVONOIDES COMO ESTRATEGIA NEUROPROTECTORA.....	12
LA QUERCETINA	15
INDUCCIÓN DE GENES CITOPROTECTORES	16
<i>HIF-1α</i>	17
<i>Nrf2.....</i>	20
<i>HO-1.....</i>	24
EFECTOS DE LA HIPOXIA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL	27
OBJETIVOS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
PROTOCOLO DE ASFIXIA PERINATAL MONITOREADA, CON O SIN INYECCIÓN DEL PREPARADO NANOSOMAL DE QUERCETINA.....	32
ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS CAMBIOS EN EXPRESIÓN GÉNICA.....	34
<i>Obtención de muestras de tejido.....</i>	34
<i>Extracción de ARN.....</i>	34
<i>Medición de Concentración de ARN</i>	35
<i>Retrotranscripción</i>	35
<i>Cebadores</i>	35
<i>PCR Tiempo Final</i>	36
<i>PCR Tiempo Real.....</i>	37
<i>Cálculos de eficiencia de Real Time</i>	38
<i>Análisis de Datos Real Time.....</i>	38
<i>Electroforesis en agarosa</i>	39
<i>Electroforesis en poliacrilamida.....</i>	39
<i>Purificación de ADN a partir de agarosa</i>	39
<i>Secuenciación</i>	39
<i>Extracción proteica: protocolo 1.....</i>	40
<i>Extracción proteica: protocolo 2.....</i>	40
<i>Fraccionamiento Proteico.....</i>	40
<i>Cuantificación Proteica.....</i>	41
<i>Electroforesis de Proteínas</i>	41
<i>Transferencia</i>	41

<i>Visualización de proteínas</i>	42
<i>Western Blot</i>	42
<i>Electroforesis Bidimensional: Isoelectroenfoque (1ª Dimensión)</i>	43
<i>Electroforesis Bidimensional: Electroforesis (2ª Dimensión)</i>	43
<i>Visualización: Tinción con nitrato de plata</i>	44
<i>Análisis de geles y aislamiento de manchas proteicas</i>	44
<i>Análisis por espectrometría de masa</i>	44
RESULTADOS	46
EXTRACCIÓN DE ARN.....	46
PUESTA A PUNTO DE LAS REACCIONES DE PCR	46
ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	49
ANÁLISIS DE NIVELES PROTEICOS MEDIANTE WESTERN BLOT	53
ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEÓMICO POR ELECTROFORESIS 2D.....	59
DISCUSIÓN	66
CAMBIOS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE ARNm EVIDENCIADOS POR REAL TIME PCR	66
CAMBIOS DE EXPRESIÓN A NIVEL PROTEICO EVIDENCIADOS POR WESTERN BLOT	69
ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	70
CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXO: PROTOCOLOS Y SOLUCIONES	93
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON EL KIT COMERCIAL ILLUSTRATE RNASPIN MINI RNA ISOLATION KIT	93
PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	94
PROTOCOLO ELECTROFORESIS EN AGAROSA	95
PROTOCOLO ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA	96
PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE AGAROSA CON KIT GFX PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION KIT.....	97
PROTOCOLO 1 EXTRACCIÓN PROTEICA	98
PROTOCOLO DE LIMPIEZA DE MUESTRAS PROTEICAS CON KIT GE HEALTHCARE 2D CLEAN UP KIT	99
FRACCIONAMIENTO PROTEICO: PROTOCOLO 1	100
FRACCIONAMIENTO PROTEICO: PROTOCOLO 2 CON KIT NE-PER NUCLEAR AND CYTOPLASMIC EXTRACTION REAGENTS	102
PROTOCOLO DE SDS-PAGE.....	104
PROTOCOLO DE VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON SOLUCIÓN DE ROJO PONCEAU	105
PROTOCOLO DE VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON SOLUCIÓN DE AZUL DE COOMASIE	106
PROTOCOLO DE VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON NITRATO DE PLATA	107
BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN WESTERN BLOT	108

Resumen

La encefalopatía hipóxica-isquémica (EHI) causada por un aporte insuficiente de oxígeno y/o sangre, es una de las mayores causas de daño cerebral en el feto, resultando en una significativa morbilidad y mortalidad. La severidad de esta condición clínica hace necesaria la búsqueda de estrategias neuroprotectoras para aquellos recién nacidos afectados de asfixia al nacer y con evidencia de presentar una EHI. El daño oxidativo es uno de los factores clave en la patología que se desencadena. La Quercetina es un flavonoide conocido principalmente por sus propiedades antioxidantes, y con antecedentes de promover una mejoría significativa de los déficits neurológicos causados por la isquemia. En base a estos antecedentes, se está trabajando sobre la caracterización de un modelo de hipoxia en cerdos recién nacidos, así como en los estudios preclínicos para evaluar la eficacia como neuroprotector de una preparación de quercetina, vehiculizada en un nanosoma, que permite la administración intravenosa. El diseño experimental utiliza tres grupos de cerdos: un grupo control, un grupo sometido a hipoxia, reanimado y sacrificado a las 8 horas, y un tercer grupo al que, tras la injuria y la reanimación, se le administra el preparado de Quercetina. En este trabajo nos proponemos aportar a este estudio caracterizando los cambios en expresión génica como resultado del daño hipóxico, así como los cambios en expresión tras el tratamiento con Quercetina. Para ello, se realizó el análisis cuantitativo de los niveles de ARNm y proteína (por RT-PCR en tiempo real y Western Blot) en corteza, estriado e hipocampo de los genes: Factor inducible por hipoxia 1α (opera como un interruptor central regulando una gran gama de genes para definir una respuesta global frente a la hipoxia), Nrf2 (factor de transcripción responsable de la inducción de una batería de genes que codifican proteínas con efecto protector antioxidante) y Hemooxigenasa-1 (regulador de la integridad celular endotelial y el estrés oxidativo). Se detectó un aumento del ARNm de HO-1 en los cerdos sometidos a hipoxia y una disminución del mismo luego de la administración de quercetina. Además, la quercetina produjo un aumento del ARNm de Nrf2 en estriado. En cuanto a HIF- 1α se observó tanto a nivel del mensajero como a nivel proteico una disminución de su expresión en los cerdos sometidos a hipoxia, y un aumento de expresión en los cerdos tratados con quercetina. A su vez, se utilizó un enfoque proteómico analizando cambios en el patrón de proteínas expresadas en la corteza cerebral, mediante electroforesis bidimensional y posterior análisis por MALDI-TOF-TOF-MS de los spots diferencialmente expresados seleccionados para su identificación. Mediante el enfoque proteómico se lograron identificar 17 proteínas con diversas funciones, principalmente relacionadas con regulación del estado redox celular, glucólisis y apoptosis. Cabe resaltar que en 10 de las proteínas analizadas el cambio observado tras la hipoxia en comparación con el grupo control, vuelven a niveles cercanos al control con el tratamiento con quercetina. Este análisis permitió ahondar en los mecanismos que subyacen al daño hipóxico, así como a la acción del tratamiento neuroprotector contribuyendo al diagnóstico de la eficacia del mismo

Introducción

Todos los órganos del cuerpo humano requieren de un suministro de oxígeno suficiente y constante para el correcto metabolismo y la supervivencia celular. Una disminución o interrupción de este suministro de oxígeno constituye una situación patológica para el organismo. El cerebro en particular, es altamente sensible a la hipoxia dado su alto consumo de oxígeno (20% del oxígeno del gasto total) y es además el primer órgano que se ve comprometido en respuesta a bajos niveles de oxígeno (Sharp & Bernaudin 2004). Más aún, cuando esta situación ocurre en el cerebro en desarrollo alrededor del momento del parto, es causante de alteraciones de la integridad estructural y funcional del sistema nervioso, determinando así severas secuelas neurológicas e incluso la muerte del neonato o del feto.

La hipoxia en el recién nacido

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) las tres principales causas de muerte en recién nacidos en el mundo son las infecciones, la prematuridad y la asfixia perinatal, representando esta última el 23% de la mortalidad neonatal global (Kurinczuk et al. 2010). Más aún, la asfixia perinatal y sus manifestaciones neurológicas son la causa más importante de daño cerebral y secuelas neurológicas en niños (Azzopardi 2010; Martínez-Biarge et al. 2010; James & Cherian 2010).

Desde el punto de vista fisiológico se puede definir la asfixia como la insuficiencia de oxígeno en el sistema circulatorio del feto y del neonato asociada a grados variables de hipercapnia y acidosis metabólica (Volpe et al. 2005). La mayoría de las causas de asfixia perinatal se originan en la vida intrauterina: el 20% antes del inicio del trabajo de parto, el 70% durante trabajo de parto y el parto; el 10% durante el período neonatal. Se han descrito al menos cinco mecanismos principales de asfixia en el neonato durante el período perinatal que incluyen: interrupción de la circulación umbilical (como compresión o accidentes del cordón), alteración del intercambio de gases en la placenta (como un desprendimiento prematuro de placenta, placenta previa sangrante, insuficiencia placentaria), alteración de la circulación hacia la placenta (como en la hipertensión arterial, hipotensión materna y alteraciones de la contractilidad uterina), deterioro de la oxigenación materna e incapacidad del recién nacido para la inflación pulmonar y transición cardiopulmonar exitosa de la circulación fetal a la postnatal (ya sea por obstrucción de vía aérea o por esfuerzo respiratorio débil) (Dixon et al. 2002).

A nivel clínico, la Asociación Americana de Ginecología y Obstetricia y su par de Pediatría han definido la asfixia como un problema caracterizado por cuatro

componentes, que deben estar todos presentes para poder diagnosticarlo: Acidosis metabólica en sangre de cordón ($\text{pH} < 7,00$), signos neurológicos en el período neonatal (hipotonía, convulsiones, coma, etc.), complicaciones sistémicas en diferentes órganos en el período neonatal, y puntaje de Apgar entre 0-3 después del quinto minuto (parámetro clínico que permite calificar la adaptación a la vida extrauterina) (Vinacur et al. 2000; Carbajal Ugarte & Pastrana Huanaco 2002).

Clínicamente se conoce como encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) al síndrome neurológico que aparece en el recién nacido tras un episodio de asfixia perinatal, es decir la interrupción del intercambio gaseoso que ocurre en el feto o recién nacido alrededor del momento del nacimiento por la falta de oxígeno (hipoxia) y/o por una perfusión tisular inadecuada (isquemia). Esta situación clínica cuando ocurre en el período prenatal y perinatal es una de las mayores causas de daño cerebral en el feto, resultando en una significativa morbilidad y mortalidad (Cowan et al. 2003; Han et al. 2002). Se estima que la encefalopatía hipóxico-isquémica se presenta con una incidencia que varía según los centros, pudiendo alcanzar 2 a 4 cada 1.000 nacidos vivos a término (Rees et al. 2011; Romero Esquiliano et al. 2004.; Robertson et al. 1989; Vannucci & Hagberg 2004). Aproximadamente entre el 10%-20% de los recién nacidos afectados muere en el período posnatal (cifra que alcanza el 60% en prematuros) y 30% queda con discapacidad neurológica (Shankaran 2009; Martínez et al. 2005). La EHI en el recién nacido se manifiesta en distintos grados de agravio neurológico dejando secuelas permanentes que afectan profundamente la calidad de vida del individuo, tales como trastornos cognitivos, trastornos psicomotores, sordera, ceguera, epilepsia, parálisis cerebral y convulsiones (Little 1966; Johnston et al. 2001).

Este síndrome cursa con alteración de las funciones neurológicas en los primeros días de vida, con dificultad para iniciar y mantener la respiración, con depresión del tono muscular y de los reflejos, con estados anormales de la conciencia, y en algunos casos, la presencia de convulsiones. El cerebro en desarrollo es particularmente susceptible a la injuria luego de un evento hipóxico-isquémico (Volpe 2001) y de acuerdo con diferentes autores, el sistema nervioso central es el más afectado en rangos entre un 60-70%, muy por encima de las alteraciones renales, pulmonares, cardíacas y gastrointestinales que van de un 42 a 29%. Además, el sistema nervioso central es el único órgano que, superada la enfermedad aguda, puede quedar secuelado para el resto de la vida.

El daño hipóxico a nivel molecular

El daño cerebral debido a un evento hipóxico-isquémico transitorio perinatal no es un

acontecimiento único, sino que es un proceso evolutivo que comienza con el insulto hipóxico-isquémico primario y que se extiende a la etapa de recuperación luego de que la oxigenación y la perfusión fueron restauradas. Esta complejidad de eventos hace que la búsqueda de estrategias neuroprotectoras para esta patología deba considerar los diferentes aspectos moleculares, muchos de ellos aún no bien conocidos. El principal mecanismo patogénico que subyace al daño neurológico en la EHI es la privación de glucosa y aporte de oxígeno, causando una falla energética primaria y el inicio de una cascada de eventos bioquímicos y moleculares que llevan a la disfunción y muerte celular (Edwards et al. 2010). Un evento hipóxico-isquémico con tal severidad como para agotar las reservas energéticas de los tejidos desencadena acidosis, edema celular, despolarización de la membrana celular, excitotoxicidad, aumento de la concentración de calcio citosólico, generación de especies reactivas del oxígeno y peroxidación de lípidos; lo cual conduce a injuria neuronal, neurodegeneración y muerte celular por apoptosis y necrosis (Dirnagl et al. 1999; Dixon et al. 2002; McDonald et al. 1988; Choi & Rothman 1990; Barks & Silverstein 1992; Martin et al. 1997; Johnston et al. 2001).

Falla energética y Acidosis

Como consecuencia inmediata del evento hipóxico-isquémico la falta de oxígeno provoca el cambio al metabolismo anaeróbico, el cual aumenta el consumo de glucosa. En esta situación, la glucosa se metaboliza a piruvato y lactato y sus protones asociados, disminuyendo así la producción de energía (producción de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, en lugar de 38 producidas en condiciones aeróbicas) y se produce la acumulación de ácido láctico tisular e iones hidrógeno, resultando así en la acidosis metabólica (Robertson et al. 1989). Ésta es, en un principio, una respuesta adaptativa beneficiosa a la privación de oxígeno, pues la acidosis tisular da lugar a la generación de ATP, y a un incremento del flujo sanguíneo cerebral (debido al efecto local de la concentración alta de ión de hidrógeno perivascular sobre el músculo liso vascular). Sin embargo, con la progresión de la formación de lactato aparece acidosis grave de los tejidos y de ello derivan tres efectos nocivos: (1) deterioro de la autorregulación vascular y con ello la posibilidad de lesión en el cerebro de origen isquémico al disminuir la presión de riego cerebral, (2) inhibición de la actividad de la fosfofructocinasa por el pH bajo, eliminándose así la fuente restante de ATP al cerebro, es decir, la glucólisis, y (3) se sucede una cascada bioquímica que determina de manera directa daño celular y finalmente necrosis (James & Cherian 2010; Rees et al. 2011; Johnston et al. 2001). De todos modos, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la injuria neuronal frente a la acidosis son multifactoriales y permanecen inciertos. Se ha sugerido que el bajo pH tisular causa una desnaturalización no selectiva de proteínas y ácidos nucleicos (Kalimo et al. 1981). A su vez, podría estimular los

intercambiadores Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ llevando al edema celular y la osmólisis (Kimmelberg et al. 1990).

La disminución de suministro de sangre y oxígeno disponible llevan eventualmente a la disminución de ATP disponible, por lo que no sorprende que las células hayan evolucionado mecanismos que preservan el ATP en condiciones de hipoxia o isquemia. Como principal consumidor de ATP, la ATPasa de Na^+/K^+ , constituye un blanco ideal para la conservación de energía. (Petrushanko et al. 2007; Jung et al. 2007; Chen et al. 2007; Zhou et al. 2008), produciéndose una disminución tanto en la actividad como en la expresión de la bomba de Na^+/K^+ dependiente de ATP, lo que causa un flujo exacerbado de Na^+ , Ca^{2+} y agua al interior celular y el subsecuente edema celular, seguido de despolarización de la membrana celular, liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios, especialmente glutamato, aumento del Ca^{2+} , activación de fosfolipasa y generación de radicales libres (Barks & Silverstein 1992; Choi & Rothman 1990; McQuillen & Ferriero 2004; Nicholls & Attwell 1990).

Excitotoxicidad

La depleción de las reservas energéticas celulares que acompaña a la hipoxia-isquemia resulta en la despolarización de las neuronas y la glía, y en la liberación de aminoácidos excitatorios al espacio extracelular. Luego del comienzo del evento hipóxico-isquémico, el glutamato extracelular aumenta rápidamente, por eflujo exacerbado y reducción de la recaptación, permitiendo que el glutamato se acumule (Dirnagl et al. 1999; Nicholls & Attwell 1990; Siesjö 1992; Benveniste et al. 1984; Nicholls 2004). La excitotoxicidad, definida como la muerte celular debida a la sobreestimulación de los receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, cumple un papel crítico en la injuria cerebral causada por un evento hipóxico-isquémico (Choi & Rothman 1990; Barks & Silverstein 1992; Portera-Cailliau et al. 1997). La liberación de glutamato causa la formación de especies reactivas del oxígeno por la disrupción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la activación de NADPH oxidasas (Brennan et al. 2009). La sobreactivación de los receptores NMDA involucra directamente la activación de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) y la generación de óxido nítrico (Dugan & Choi 1994). La producción de óxido nítrico está vinculada a la muerte neuronal a través de varios mecanismos bien descritos: (a) reacción con radical superóxido derivado de la mitocondria para formar peroxinitrito (Huie & Padmaja 1993), un radical que se descompone para formar radical hidroxilo con subsecuente daño al ADN, proteínas y membranas; (b) competencia con el oxígeno en la citocromo c oxidasa resultando en la inhibición de la respiración mitocondrial, disipación del potencial de membrana mitocondrial y falla energética (Brorson et al. 1999; Ushmorov et al. 1999; Koivisto et al.

1997); (c) la S-nitrosilación de proteínas nucleares lo que deriva en su degradación y en muerte celular (Hara & Snyder 2007).

Aumento del calcio intracelular

El calcio citosólico aumenta como resultado de varios eventos. La depleción del ATP intracelular enlentece la actividad de las calcio ATPasas, las cuales son usadas para excluir el calcio de la célula. Además, la despolarización de la membrana plasmática activa los canales de calcio dependientes de voltaje (voltage gated) y la liberación de glutamato actúa sobre los receptores de glutamato permeables al calcio permitiendo el flujo de calcio al interior celular (Choi 1988). La sobrecarga intracelular de calcio excesiva lleva a la activación inapropiada de sistemas enzimáticos incluyendo la oxido nítrico sintasa, proteasas, fosfolipasa A2 y endonucleasas (Lee et al. 1999; Simonian & Coyle 1996; Coyle & Puttfarcken 1993).

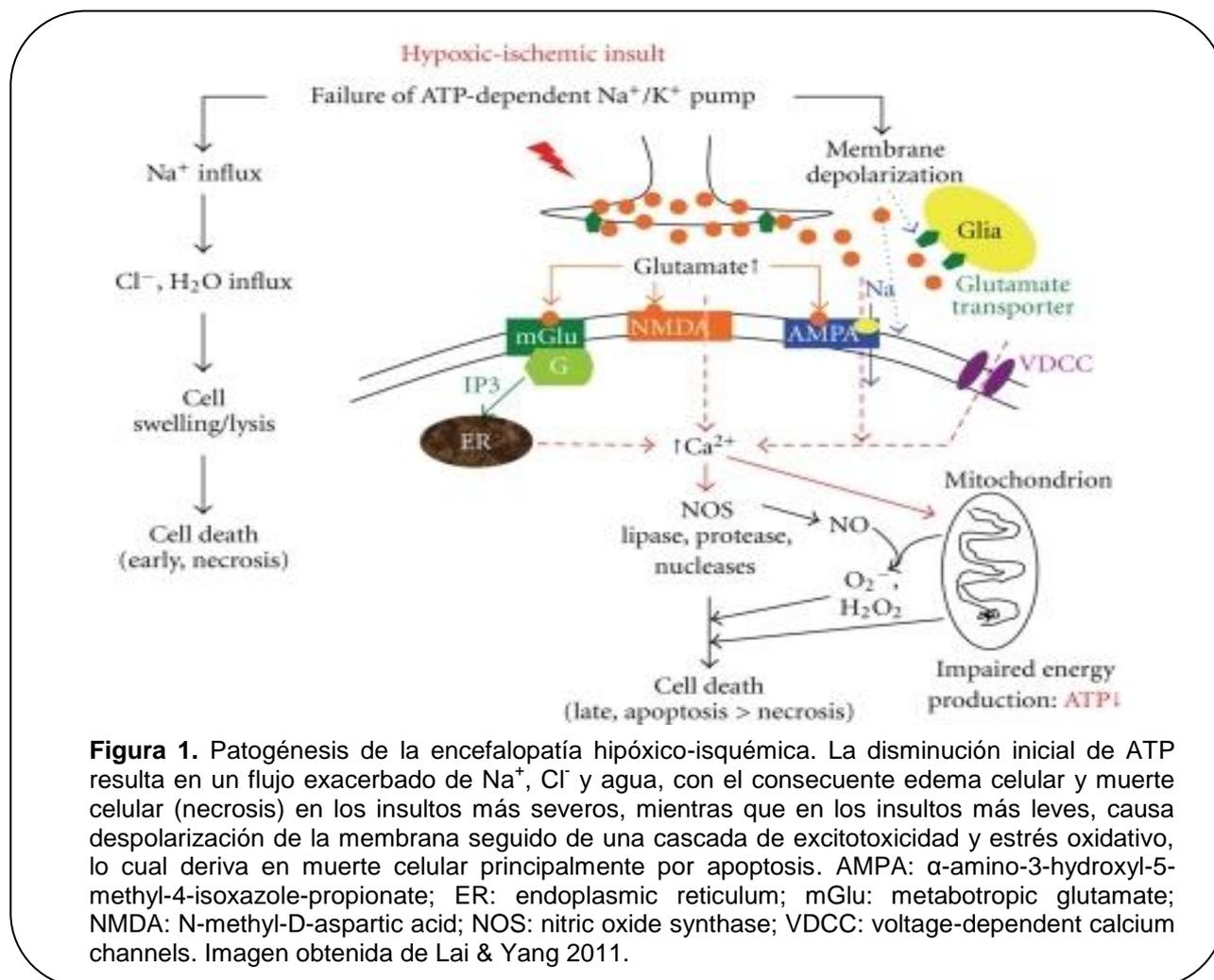
Los efectos combinados de la falla energética celular, la acidosis, la liberación de glutamato, la acumulación de Ca^{2+} intracelular, la peroxidación de lípidos y la neurotoxicidad provocada por el ácido nítrico llevan a la disrupción de componentes esenciales de la célula y la muerte celular (Figura 1).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo, debido a cambios patológicos en la homeostasis de las especies reactivas del oxígeno (ROS), que reflejan una producción anormal y/o una eliminación limitada, ha sido implicado como un mecanismo clave que contribuye al daño tisular y a los déficits funcionales en la injuria cerebral hipóxica-isquémica (Sugawara & Chan 2003). El cerebro neonatal, en especial, es susceptible al daño oxidativo debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados, a la alta tasa de consumo de oxígeno, a una baja cantidad de moléculas antioxidantes y a una aumentada disponibilidad de Fe^{2+} (Siddappa et al. 2002; McQuillen & Ferriero 2004).

Los mecanismos detrás del aumento de las especies reactivas del oxígeno son varios como ya hemos señalado, algunos de ellos son consecuencia de la disfunción mitocondrial, y de la activación de enzimas como la oxido nítrico sintasa neuronal, la xantina oxidasa y las NAD(P)H oxidasas. La producción de especies reactivas del oxígeno, sin embargo, es mucho mayor durante la etapa de reperfusión y reoxigenación (Lowry et al. 1951). La reoxigenación y reperfusión tienen importancia en la patogenia de la enfermedad, pues se ha confirmado que esta etapa lleva a la formación de radicales libres. La producción aumentada de ROS y RNS (especies reactivas del nitrógeno)

llevan al daño celular y promueven la muerte celular, debido a la oxidación de componentes celulares esenciales tales como lípidos, proteínas y ADN, y alteración de vías de señalización (Chan 2001).



Estado actual de la atención al recién nacido asfíctico

El tratamiento del recién nacido con asfisia perinatal se ha limitado a los cuidados intensivos y al tratamiento de las convulsiones. Por un lado, se realizan cuidados de soporte general (adecuada oxigenación y ventilación, sostén de la tensión arterial y de un estado normoglicémico). Por otro lado, el control y manejo de las convulsiones se realiza con fenobarbital. Las convulsiones no reconocidas y no tratadas generan mayor caída de la glucosa, aumento de lactato, disminución de los fosfatos de alta energía, mayor hipoxemia, hipercapnia, aumento de la presión sanguínea con incremento de la posibilidad de hemorragias en el SNC (Shankaran et al. 2009.; Nozar et al., 2005).

Se ha demostrado la utilidad del alopurinol para disminuir edema y extensión del daño



neuropatológico en animales de experimentación. Sin embargo, en recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica, este tratamiento no ha mostrado disminución de morbilidad y mortalidad (Buonocore et al. 2012; Legido et al. 2007). A su vez, algunos opioides, como la morfina y el fentanyl se han evaluado en su efecto neuroprotector, y se postula como mecanismo el aumento del nucleósido de adenosina endógeno con disminución del flujo de calcio intracelular. Sin embargo, debido a sus efectos colaterales, se recomienda precaución en la interpretación de los resultados, por lo que se requieren más estudios para validar su utilización (Legido et al. 2007).

En los últimos años, se ha evaluado la utilización de la hipotermia como una alternativa de tratamiento de niños con asfixia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica. Se emplea leve hipotermia con disminución de la temperatura corporal entre 1°C a 3°C (33-34°C) con una duración de 72 horas. Los efectos adversos del tratamiento con hipotermia incluyen: aumento de la viscosidad sanguínea, acidosis metabólica, disminución de la disponibilidad de oxígeno, incremento del potasio extracelular, arritmias cardíacas, alteración de la coagulación, disfunción de plaquetas y síndrome coreico (Shankaran 2009; Jacobs et al. 2007; Schulzke et al. 2007). La hipotermia controlada ha sido propuesta como una intervención terapéutica con resultados beneficiosos en aquellas encefalopatías catalogadas como moderadas (Thoresen et al. 1995), no existiendo hasta el día de hoy ninguna terapia aplicable o exitosa en encefalopatías severas. Es la única recomendada hoy en día para su uso a nivel clínico.

La severidad de las EHI y la ausencia de terapias eficaces, hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de neuroprotección para aquellos recién nacidos afectados de asfixia al nacer y con evidencia de presentar una encefalopatía hipóxico-isquémica. La alta morbilidad, los costos socioeconómicos altos y la falta de tratamientos específicos son factores claves que definen la relevancia de las patologías cerebrales en la salud humana y la importancia de la búsqueda de agentes neuroprotectores. La falta de estrategias preventivas y terapias farmacológicas, así como la existencia de datos dispersos en un diverso número de modelos, explica la importancia de contar con un modelo de hipoxia perinatal *in vivo*, que facilite la caracterización de los mecanismos relevantes para el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas.

Actualmente, el Departamento de Neonatología del Hospital de Clínicas y el Depto. de Neuroquímica del IIIBCE están llevando a cabo, en el marco de un proyecto multidisciplinario, la caracterización de un modelo de hipoxia en cerdos recién nacidos, así como los estudios preclínicos para evaluar la eficacia como protector cerebral de una preparación de quercetina, vehiculizada en un transportador lipídico de

pequeño tamaño (nanosoma) que permite la administración intravenosa (Dajas et al. 2014).

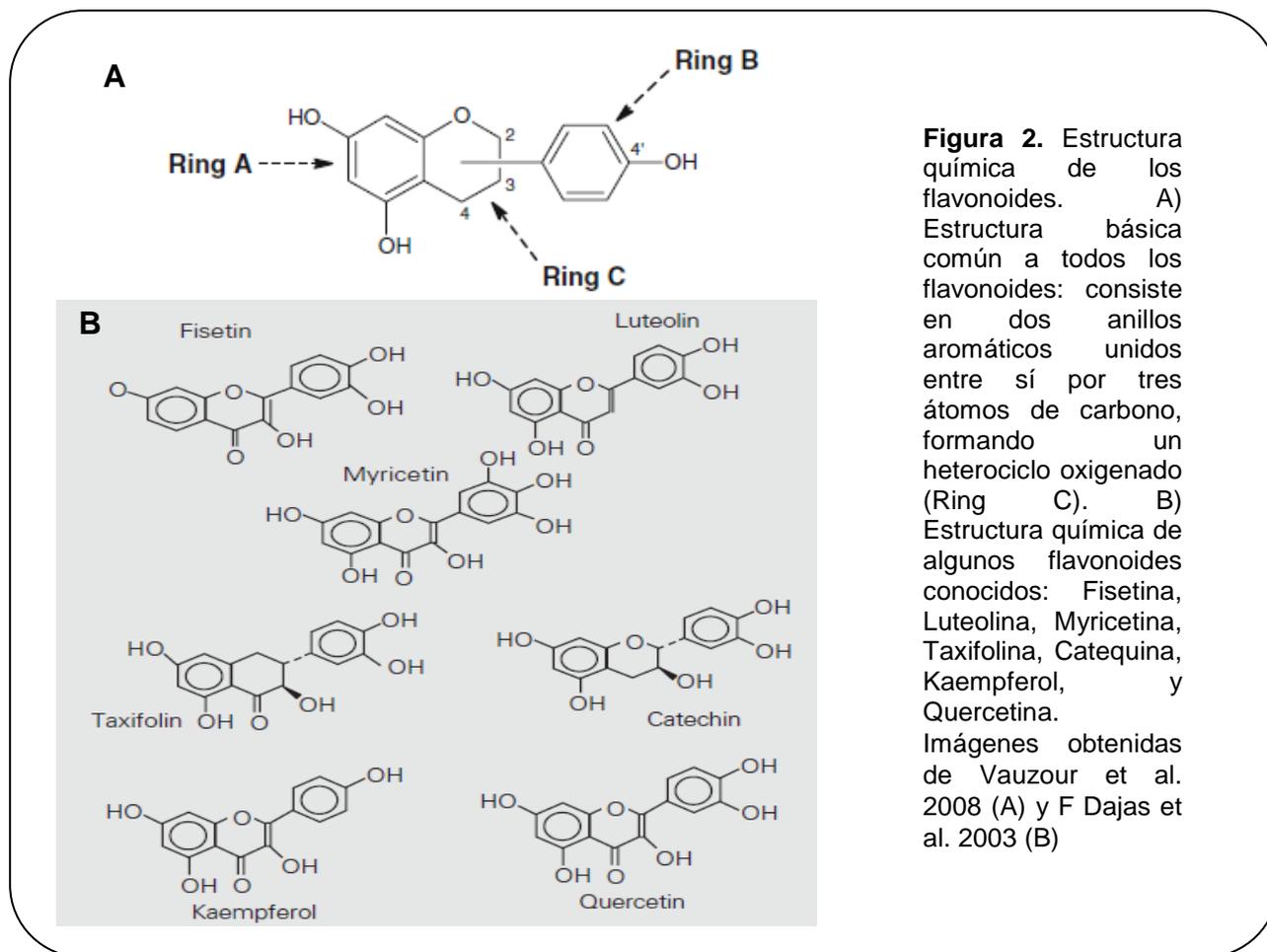
El cerdo como modelo animal

El uso de cerdos recién nacidos en estudios de hipoxia e isquemia cerebral es un poderoso modelo *in vivo* que emula muchos de los aspectos fisiopatológicos de los neonatos humanos asfícticos. Si bien ningún modelo animal es capaz de replicar a la perfección la complejidad de los eventos hipóxicos-isquémicos que se dan en el humano neonato, el modelo suino ofrece ciertas ventajas ya que reproduce los estados de maduración, la morfología y mecanismos específicos relevantes en las respuestas dependientes de la edad a este tipo de injurias. Los cerdos recién nacidos poseen una morfología cerebral, y una tasa de sustancia gris/sustancia blanca similar a la de humanos. Además, el pico de maduración cerebral que se da en el cerdo en la fase perinatal es altamente comparable al cerebro neonatal humano en términos de desarrollo neurológico (Dickerson & Dobbing 1966).

En suma, el cerdo es un animal con alta homología con el humano tanto a nivel genético, como anatómico y fisiológico. Además permite, gracias a sus dimensiones, el uso de monitores y equipos médicos para realizar controles estrictos de los parámetros hemodinámicos, electroencefálicos y metabólicos, durante y después de la hipoxia (Martin et al. 1997).

Los flavonoides como estrategia neuroprotectora

Los efectos beneficiosos de las frutas y vegetales son bien conocidos y se han atribuido mayormente a los polifenoles. Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que se caracterizan por poseer más de un anillo fenólico y por la ausencia de grupos funcionales que contienen nitrógeno en su estructura (Quideau et al. 2011). Según su estructura los polifenoles pueden dividirse en diferentes clases, y los flavonoides son la clase más grande e importante y son componentes abundantes de la dieta humana (Matter et al. 1992; Chang et al. 1993). Los flavonoides están presentes en altas concentraciones en cítricos, manzanas, uvas, vino tinto, aceite de oliva, té, chocolate y cocoa (Kris-Etherton et al. 2004). Sin embargo, cada una de estas fuentes alimenticias tiene un contenido en flavonoides diferente tanto en concentración como en composición. Los flavonoides comparten una estructura que consiste en dos anillos aromáticos unidos entre sí por tres átomos de carbono, formando un heterociclo oxigenado (Figura 2).



En los últimos años, la asociación entre varias subclases de flavonoides y el riesgo de accidentes cerebrovasculares ha sido estudiado. En general, estos estudios sugieren que una ingesta alta de flavonoides disminuye el riesgo de accidentes cerebrovasculares (Mursu et al. 2008; Mizrahi et al. 2009; Hollman et al. 2010; Cassidy et al. 2012). Un número considerable de estudios muestran que los flavonoides promueven la función vascular, reducen la hipertensión, y reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares (Arab & Liebeskind 2010; Arts & Hollman 2005). Se han descrito para los flavonoides también otros efectos como antitumoral, antitrombótico, antiinflamatorio y antiapoptóticos, así como efectos de inhibición de la agregación plaquetaria (Fujiki et al. 1986; Beretz et al. 1982; Gryglewski et al. 1987; Scambia et al. 1990; Yoshida et al. 1990; Juurlink & Paterson 1998).

Recientemente ha habido un creciente interés en el potencial neuroprotector de los flavonoides. Se ha postulado que sus efectos en el cerebro son mediados por la habilidad para proteger neuronas vulnerables, estimular la regeneración neuronal e inducir neurogénesis (Spencer 2008). Ejercen también efectos beneficiosos sobre la memoria y podrían prevenir la pérdida cognitiva asociada al envejecimiento (Joseph et al. 1999; Joseph et al. 1998). Se ha demostrado que los flavonoides como los glicósidos

de quercetina, la epicatequina, la catequina, glicósidos de cianidina, y el ácido clorogénico exhiben propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y neuroprotectoras tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Simonyi et al. 2005; Gutierrez-Merino et al. 2011; Wang et al. 2011; Kim et al. 2012) y se ha demostrado su eficacia en una amplia variedad de modelos preclínicos de injuria cerebral isquémica (Simonyi et al. 2005; Gutierrez-Merino et al. 2011). Su potencial neuroprotector también ha sido demostrado en condiciones de estrés oxidativo (Inanami et al. 1998).

Entender los mecanismos responsables de estos beneficios en la salud es esencial en el desarrollo de nuevas estrategias no solo para mitigar el riesgo de accidentes cerebrovasculares, sino también para identificar nuevos blancos en el diseño de terapias que puedan ser aplicadas luego del insulto.

Históricamente, las acciones biológicas de los flavonoides se han atribuido a su capacidad intrínseca para ejercer acciones antioxidantes a través de su habilidad para eliminar especies reactivas, o a través de su posible influencia en el estado redox intracelular (Galli et al. 2002; Pollard et al. 2006). Sin embargo, se ha especulado que esta actividad antioxidante no explica la bioactividad de los flavonoides *in vivo*. Es probable que eliminar el exceso de radicales libres pueda restaurar el equilibrio redox en el inicio del estrés oxidativo celular. Pero en insultos celulares masivos como la isquemia, que involucra falla metabólica, pérdida de la homeostasis del calcio y excitotoxicidad, la actividad "scavenger" puede no ser suficiente para proteger a las células del daño oxidativo.

En los últimos años, se ha puesto en evidencia que los flavonoides pueden influenciar el destino celular por otros mecanismos de acción que involucran la interacción con lípidos y proteínas resultando en la modulación enzimática, interacción con receptores, modulación de cascadas de señalización intracelular y modulación de la expresión génica (Mandel et al. 2008; Spencer 2009b; Spencer 2009a; Nijveldt et al. 2001; Williams et al. 2004; Fraga 2007).

Numerosos estudios han demostrado que la neuroprotección mediada por los flavonoides en los eventos hipóxico-isquémicos está cercanamente asociada a cambios adaptativos en la expresión de muchos genes que aumentan la resistencia al daño cerebral isquémico (Weinreb et al. 2003b; Weinreb et al. 2003a; Zhang et al. 2005; Wang et al. 2007; Nicholson et al. 2008; Ritz et al. 2008; Ma et al. 2010; Dirscherl et al. 2010).

La quercetina

La quercetina es un flavonol, cuya nomenclatura IUPAC es 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanona, y es el flavonoide más abundante en la naturaleza y en la dieta humana. La quercetina es conocida por exhibir numerosos efectos biológicos y farmacológicos gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas (Meyers et al. 2008; Lee et al. 2010; Vargas & Burd 2010).

Se ha demostrado que la quercetina inhibe la proliferación celular, induce la apoptosis y la respuesta antioxidante. La actividad antioxidante intrínseca de la quercetina se ha atribuido a la eliminación directa de ROS, a través de la abstracción de electrones desapareados o átomos de hidrógeno, o a la quelación de metales pesados que previene la generación de radicales hidroxilo a través de reacciones de tipo Fenton. Estas propiedades son principalmente resultado de la estructura química de la quercetina, en particular de la presencia y ubicación de las sustituciones hidroxilo y el anillo catecol tipo B (figura 2B) (Quideau et al. 2011). Recientemente, se ha propuesto que la quercetina también puede ejercer efectos moduladores sobre las vías de señalización celular. Por ejemplo, los efectos antiinflamatorios de la quercetina están asociados a la inhibición de NF-κB (Lee et al. 2008), previene el daño oxidativo activando kinasas MAPK (JNK y p38), la vía PI3K/Akt (Weng et al. 2011) y afecta numerosos blancos de vías de señalización vinculadas a la apoptosis (Kim et al. 2010).

Numerosas evidencias *in vitro* en neuronas en cultivo (Dajas et al. 2003b; Dajas et al. 2005; Ossola et al. 2009) afirman una acción protectora de quercetina frente a diversas agresiones, principalmente oxidativas. Las evidencias *in vivo* han explorado diversos paradigmas en experimentos de trauma (Schültke et al. 2010), hipoperfusión cerebral (Takizawa et al. 2003) o isquemia cerebral transitoria (Cho et al. 2006) y permanente (Rivera et al. 2004). Sin embargo, la valoración de su actividad neuroprotectora en la asfisia perinatal y de sus mecanismos de acción no ha sido explorada *in vivo*.

El consumo oral de los compuestos flavonoides, implica que deben pasar por el tracto gastrointestinal y el hígado y estar sujetos a numerosas alteraciones bacterianas y enzimáticas, antes de alcanzar la distribución sistémica (Serafini et al. 2010). De hecho, se ha demostrado que los flavonoides tienen una baja biodisponibilidad cuando son administrados vía oral (Manach et al. 2004; Kahle et al. 2005; de Boer et al. 2005; Morand et al. 2000) por lo que los efectos neuroprotectores de estos compuestos típicamente son examinados luego de la inyección intraperitoneal o intravenosa (Ossola et al. 2009).



En particular, la quercetina sufre una importante metabolización hepática (glucoronización, metilación, etc.) debido a la cual los niveles circulantes del flavonoide libre son muy bajos (Bischoff 2008). Si a esto se le agrega que la naturaleza lipofílica de la quercetina dificulta su disolución en medios hidrosolubles para su acceso al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, la necesidad de un transportador que proteja a la molécula de la metabolización y facilite el acceso cerebral aparece como una exigencia clave para estudiar *in vivo* el efecto terapéutico. La encapsulación de quercetina en un liposoma muy simple, con lecitina, realizada por Dajas y colaboradores (Dajas et al. 2002) facilita el acceso de la quercetina a través de la barrera hematoencefálica. Con la administración de esta preparación se demostró que se podía observar protección cerebral en un modelo de isquemia focal en ratas (Rivera et al. 2004). Sin embargo, la formulación liposomal de quercetina se administró en forma intravenosa a cerdos recién nacidos sometidos a hipoxia cerebral severa, lo que resultó en marcados efectos tóxicos, con hipertensión pulmonar, posiblemente por el tamaño del liposoma, la presencia de cristales lipídicos depositados con lecitina, la aún baja solubilidad de quercetina, o una reacción mediada por complemento denominada "seudo alergia" inducida por colesterol.

Por estas razones se emprendió un intenso trabajo de desarrollo de una formulación de menor tamaño (nanosomal), modificando asimismo la formulación del nanosoma con el agregado de colesterol y β -ciclodextrina, lo que incrementó notoriamente la solubilidad de quercetina y la estabilidad del transportador (Dajas et al. 2014).

Inducción de genes citoprotectores

Cuando el suministro de oxígeno no satisface la demanda celular, se pone en marcha una respuesta adaptativa que intenta compensar el desbalance energético para mantener la función celular. Frente a un estrés hipóxico, las células inducen una respuesta adaptativa que incluye aumentar la tasa de glicólisis y angiogénesis o experimentan la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis. Un mecanismo de esta respuesta adaptativa es la regulación transcripcional de una batería de genes que responden frente a la hipoxia. De hecho, se ha evidenciado que miles de genes son influidos por exposición a la hipoxia (Sonna et al. 2003; Vengellur et al. 2003; Vengellur et al. 2005).

Las vías de protección endógenas pueden ser activadas en el cerebro en respuesta a una gran variedad de estímulos. Las moléculas neuroprotectoras endógenas, incluidos los factores de transcripción, son consideradas nuevos blancos terapéuticos contra diversas neuropatologías. Dado que altos niveles de estas moléculas se relacionan con mejores resultados fisiológicos, las estrategias que puedan regular positivamente su

expresión se espera que sean neuroprotectoras.

En este trabajo, se decidió estudiar la expresión, tanto en respuesta a la hipoxia como a un tratamiento neuroprotector con quercetina, de tres genes y su producto génico correspondiente: HIF-1 α (opera como un interruptor central regulando una gran gama de genes para definir una respuesta global frente a la hipoxia), Nrf2 (factor de transcripción responsable de la inducción de una batería de genes que codifican proteínas con efecto protector antioxidante) y Hemo oxigenasa-1 (regulador de la integridad celular endotelial y el estrés oxidativo).

HIF-1 α

El fino balance entre supervivencia y muerte celular está regulado en gran parte por una familia de factores de transcripción llamada Factores Inducibles por Hipoxia (HIF por sus siglas en inglés Hypoxia-Inducible Factors) que interaccionan con un elemento en cis llamado Elemento de Respuesta a Hipoxia (HRE por sus siglas en inglés Hypoxia-Responsive Elements) localizado en las regiones regulatorias de los genes blanco. En los últimos años se ha hecho evidente que las células tienen la capacidad intrínseca de sentir y adaptarse a los niveles de oxígeno a través de HIF-1 (Semenza 2004).

La familia de HIFs pertenece a la superfamilia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice que se caracteriza por contener un dominio periodic-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-singleminded (Per-ARNT-SIM,PAS) que controla la dimerización y la unión de las subunidades al ADN (Huang et al. 1993; Hogenesch et al. 1997; LaPres et al. 2000). Las HIF son proteínas heterodiméricas que comprenden una subunidad α y una subunidad β . La clase alfa está compuesta por HIF-1 α , HIF-2 α and HIF-3 α . Las subunidades beta incluyen al aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT, también conocido como HIF-1 β) y ARNT2.

HIF-1, compuesto por HIF-1 α y HIF-1 β , es el más ampliamente estudiado de esta familia de factores de transcripción y es el principal regulador de la respuesta a hipoxia en la mayoría de las células de mamífero (Semenza 1998; Wang et al. 1995). La subunidad β es una proteína nuclear expresada constitutivamente, mientras que la expresión y actividad de la subunidad α está fuertemente regulada por la concentración de oxígeno. En células bien oxigenadas, HIF-1 α es una proteína con un tiempo de vida excepcionalmente corto, con una vida media menor a 5 minutos a 21% O₂, y sus niveles basales son muy bajos, mientras que durante la hipoxia la subunidad α se estabiliza y es capaz de translocarse al núcleo donde dimeriza con HIF-1 β , y es entonces capaz de activar la transcripción de sus genes blanco. La activación de HIF-1 α es, por tanto, un

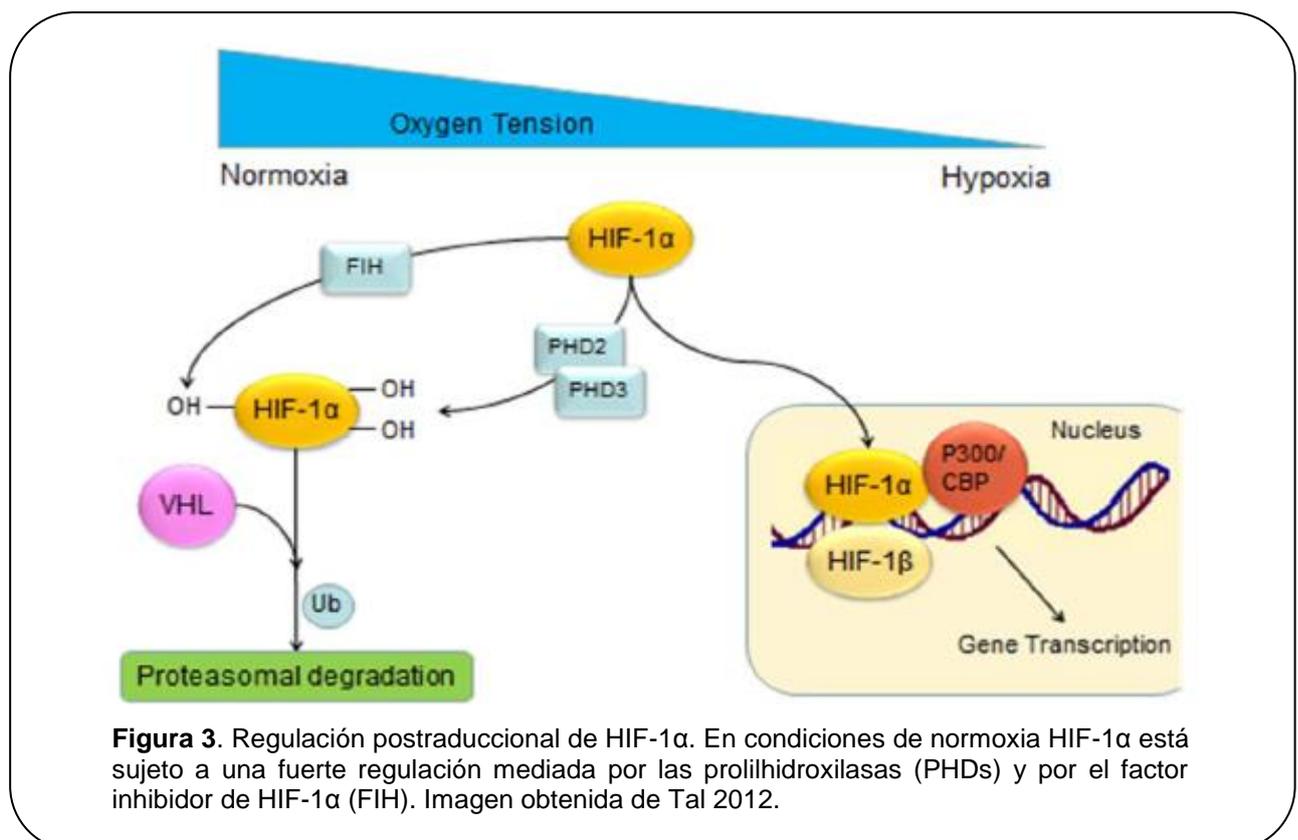
proceso de varios pasos que implica la estabilización de HIF-1 α , translocación nuclear, heterodimerización, activación transcripcional e interacción con otras proteínas (Semenza 2004).

La subunidad HIF-1 α está regulada de dos formas distintas. Por un lado, en condiciones de normoxia, HIF-1 α es rápidamente degradado en el proteasoma. Este proceso es mediado por las prolilhidroxilasas (PHD) que modifican la subunidad alfa, de forma dependiente de oxígeno, en residuos de prolina en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD por sus siglas en inglés oxygen-dependent degradation domain) (Bruick & McKnight 2001; Epstein et al. 2001). Las hidroxilaciones de prolina son requeridas para la interacción de HIF-1 α con la proteína supresora de tumores Von-Hippel Lindau (pVHL). pVHL sirve como el componente de reconocimiento de una E3 ubiquitin ligasa que lleva a la ubiquitinación y degradación proteosomal de HIF-1 α (Bruick & McKnight 2001; Epstein et al. 2001).

Por otro lado sufre inactivación transcripcional luego de ser hidroxilada en una asparagina por el factor inhibidor de HIF (FIH) (Lando et al. 2002; Mahon et al. 2001; Sang et al. 2002). FIH parece tener un rol secundario al de las PHDs, ejerciendo un nivel adicional de control negativo sobre HIF-1 α que pueda haber escapado a la degradación (Stolze et al. 2004). En condiciones de normoxia, el factor inhibidor de HIF media la hidroxilación oxígeno dependiente de la Asparagina 803 dentro del Dominio de Transactivación C' Terminal (CTAD por sus siglas en inglés C' Terminal Transactivation Domain) (Mahon et al. 2001), y esta hidroxilación previene la unión del co-activador p300/CBP a HIF-1 α lo cual impide que HIF active la transcripción dependiente de p300 (Lando et al. 2002) (figura 3).

Estas hidroxilasas requieren 4 compuestos fundamentales para su actividad: oxígeno, hierro, α -cetoglutarato y ascorbato. El oxígeno y el α -cetoglutarato funcionan como co-substratos de la reacción enzimática, mientras que el Fe²⁺ y el ascorbato funcionan como co-factores. Tanto el oxígeno, como el hierro y los productos enzimáticos de la reacción juegan un papel crítico en la regulación de las hidroxilasas. La concentración baja de oxígeno inhibe la hidroxilación de HIF-1 α , ya sea mediada por las PHD como por el FIH, lo que lleva a la acumulación de HIF-1 α y a la consecuente activación de HIF-1 (Bruick & McKnight 2001; Epstein et al. 2001; Jeong et al. 2002; Lando et al. 2002). Las hidroxilasas son capaces entonces de sensar la disminución en la concentración de oxígeno celular, ya que estas enzimas requieren oxígeno para su actividad. La falta de oxígeno disponible inhibe la habilidad de la enzima para modificar HIF-1 α lo cual lleva a una estabilidad aumentada del factor de transcripción.

En la estabilización de HIF-1 α , distintos laboratorios han reportado un rol para las especies reactivas del oxígeno generadas en la mitocondria (Chandel et al. 1998). La hipoxia causa la inhibición de la Cadena de Transporte de Electrones y la generación de ROS en varios sitios potenciales. Se ha propuesto que este estrés oxidativo dentro de la célula inhibe la actividad catalítica de las PHD debido a que se inhibe la habilidad del hierro de ciclar entre estados de oxidación. Los niveles de ROS en el citosol resultan en la inhibición de las PHD, lo cual lleva a la inducción de la actividad transcripcional de HIF (Chandel & Schumacker 2000; Gong & Agani 2005; Guzy et al. 2005).



Además de la hidroxilación, otras modificaciones han sido vinculadas a HIF-1 α . La acetilación en la lisina 532 aumenta la interacción entre HIF-1 α hidroxilada y pVHL (Jeong et al. 2002; Fisher et al. 2005). MAPK fosforila a HIF-1 α y aumenta la actividad transcripcional de HIF-1 (Richard et al. 1999; Sang et al. 2003). La actividad de HIF-1 también es regulada de forma independiente a la concentración de oxígeno por ciertos factores de crecimiento que aseguran el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno en los tejidos normales en crecimiento. Estas respuestas resultan de la activación de la vía de señalización de la (PI3K)/AKT/mTOR que lleva a un aumento en el factor de traducción eIF-4E, el cual a su vez aumenta la traducción del ARNm de HIF-1 α (Sang et al. 2003; Semenza 2003).

Se ha encontrado que además de la hipoxia, HIF-1 α puede ser inducido por otros agentes químicos como el óxido nítrico, iones metálicos (por ejemplo Nickel y Cobalto) y quelantes de hierro (por ejemplo DFO desferrioxamina), y agentes biológicos como los flavonoides y en particular la quercetina (Fandrey et al. 2006; Metzen et al. 2003; Pan et al. 2007; Chowdhury et al. 2011; Wilson & Poellinger 2002; Jeon et al. 2007; Triantafyllou et al. 2007; Park et al. 2008). Dichos agentes modulan la vía de activación de HIF-1 α inhibiendo a las PHDs.

En suma, existen diversas formas de regulación de la actividad de HIF, tanto dependientes como independientes de oxígeno. La importancia relativa de estos mecanismos en la fisiología normal y en la fisiopatología aún debe ser determinada.

A su vez, HIF-1 regula la transcripción de muchos genes involucrados en la respuesta celular y sistémica a la hipoxia. Hasta el momento, se han identificado más de 100 genes blanco de HIF-1, involucrados en funciones diversas como son: angiogénesis, eritropoyesis, metabolismo energético, regulación del pH, proliferación celular, migración celular, y apoptosis (Semenza 2004). Dentro de los genes regulados por HIF-1 se encuentran EPO (eritropoyesis), VEGF (angiogénesis), GLUT-1 (captación de glucosa), iNOS (vasodilatación), HO-1 (scavenging de radicales libres), lactato deshidrogenasa (utilización de lactato), y enzimas de la glicolisis (Semenza 2002; Gunaratnam & Bonventre 2009; Rosenberger et al. 2005).

Esta activación génica apunta a restaurar una oxigenación adecuada y a eliminar el déficit energético generado por la disminución de oxígeno disponible, y contribuye así a la supervivencia de las células hipóxicas. Sin embargo, esta respuesta adaptativa desencadenada por HIF-1 no siempre es capaz de contrarrestar el daño generado por la hipoxia. En estos casos, las células comienzan a modular vías de muerte celular, posiblemente como una forma de eliminar aquellas dañadas irremediablemente (Coleman et al. 2002; Shinkai et al. 2005). En esta situación HIF-1 también juega un rol esencial activando la transcripción de varios factores proapoptóticos (Piret et al. 2002; Denko et al. 2003; Vengellur et al. 2003). Se cree que esta vía de citotoxicidad es un intento de mantener la integridad del tejido, ya que la eliminación de las células bajo un estrés hipóxico severo podría aumentar la posibilidad de supervivencia de las células vecinas al aumentar los nutrientes y el suministro de oxígeno, manteniendo así una arquitectura tisular apropiada (Lee et al. 2007).

Nrf2

El estrés oxidativo juega un rol muy importante en la fisiopatología de los eventos

hipóxico-isquémicos (Clemens 2000), Para contrarrestar estos insultos, la célula ha evolucionado mecanismos de defensa complejos (Ishii et al. 2002).

El factor de transcripción Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) es el guardián de la homeostasis del estado redox, y regula la inducción coordinada de una batería de genes citoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios en respuesta al estrés oxidativo y a la inflamación (Jaiswal 2004; Nguyen et al. 2009). Un creciente número de estudios sugieren que la activación de Nrf2 constituye una vía neuroprotectora que confiere resistencia a una gran variedad de insultos neurodegenerativos asociados al estrés oxidativo (Liu et al. 2004; Shah et al. 2007; Vargas et al. 2008). Ciertos estudios han puesto en evidencia que el aumento de la actividad de Nrf2 es altamente neuroprotector en modelos *in vitro* que simulan algunos de los componentes del daño asociado a los accidentes cerebrovasculares como la exposición a H₂O₂, toxicidad mediada por glutamato, entre otros (Murphy et al. 1991; Duffy et al. 1998; Lee et al. 2003; Shih et al. 2003a; Kraft et al. 2004). La respuesta transcripcional mediada por Nrf2 también ha demostrado ser protectora en una variedad de modelos experimentales animales incluyendo injuria pulmonar oxidativa, fibrosis, asma, e isquemia/reperfusión cerebral (Cho et al. 2002; Cho et al. 2004; Shih et al. 2005). Es así, que la sobreexpresión de Nrf2 puede ser una estrategia terapéutica potencial con el fin de mitigar injurias inducidas por estrés oxidativo.

El factor de transcripción Nrf2 pertenece a la subfamilia de Cap 'n' Collar de la familia de factores de transcripción bZip (Basic-Leucine Zipper). La región C' terminal básica, rica en leucinas, es responsable de la unión al ADN, mientras que la región N' terminal ácida, rica en Aspartato y glutamato, funciona como el dominio de activación transcripcional (Moi et al. 1994). Nrf2 se une al elemento regulatorio en cis denominado ARE (Antioxidant Response Element) en el promotor de muchos genes antioxidantes y detoxificantes, llamados genes de Fase II (Ishii et al. 2000; Kobayashi & Yamamoto 2005) controlando la expresión génica tanto inducible como constitutiva. Requiere para su unión al elemento ARE y para la activación transcripcional, la formación de un heterodímero con otras proteínas bZip incluyendo miembros de la familia Maf (MafG, MafK, MafF) y Jun (c-Jun, Jun-D, and Jun-B) (Itoh et al. 1997).

Los genes de la fase II trabajan en sinergia para constituir una defensa celular pleiotrópica para eliminar las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, a través de reacciones enzimáticas secuenciales (Ishii et al. 2000; Li et al. 2002; Thimmulappa et al. 2002; Shih et al. 2003b). Además estos genes contribuyen a la detoxificación de xenobióticos y al mantenimiento del potencial redox. Dentro de los genes inducidos por Nrf2 se encuentran: hemooxigenasa-1 (HO-1), glutatión S-transferasas (GSTs),



NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1), glutamato cisteína ligasa (GCL), glutatión peroxidasa-2, superóxido dismutasa 1 (SOD1), UDP glucuronil transferasa (UDP-GT), Tioredoxina (TRX), catalasa, y glutatión reductasa (Hayes & McMahon 2001; Kensler et al. 2007; Lau et al. 2008; Motohashi & Yamamoto 2004; Nguyen et al. 2003a; Klaassen & Slitt 2005). Otros genes blanco de Nrf2 están involucrados en una amplia variedad de funciones y procesos celulares tales como crecimiento celular, apoptosis, reparación del ADN, respuesta inflamatoria, y vías de degradación proteica (Zhang 2006). La naturaleza diversa de los genes blanco de Nrf2 demuestran su importancia vital en la protección y supervivencia celular.

Nrf2 es expresado de forma ubicua en una amplia gama de tejidos y tipos celulares. Sin embargo, su estabilidad es dependiente del estado redox celular. Durante la exposición de las células a estrés oxidativo u otros insultos químicos electrofílicos la actividad de Nrf2 aumenta considerablemente (McMahon et al. 2001; Moi et al. 1994; Chan et al. 1993).

El mecanismo de activación de Nrf2 más estudiado hasta el momento se basa en la estabilización postraducciona de la proteína. Nrf2 es transcrito y traducido constitutivamente, sin embargo posee una vida media relativamente corta de 15 minutos (Nguyen et al. 2009). Su estabilidad proteica es regulada mediante la asociación con la proteína Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (Itoh et al. 1999; Kang et al. 2004). Keap1 es una proteína rica en cisteínas, conteniendo 25 residuos de cisteína, 3 de las cuales (C151, C273, and C288) son reactivos a pH fisiológico y serían críticos en la regulación de Nrf2. El estrés oxidativo causaría modificaciones químicas (oxidaciones y S-alquilaciones) en estas cisteínas provocando cambios conformacionales en la proteína (con formación de nuevos puentes disulfuro) lo que generaría la disociación de Nrf2 de Keap1 (Kobayashi et al. 2004; Motohashi & Yamamoto 2004; Padmanabhan et al. 2006; Zhang et al. 2004).

De acuerdo con el modelo más ampliamente estudiado hasta el momento, Nrf2 sería una proteína localizada en el citoplasma celular donde se asociaría con un dímero de Keap1 (Itoh et al. 1999). Keap1, además de interactuar con los filamentos de actina y secuestrar a Nrf2 en el citoplasma celular, forma parte del complejo Cul3-Keap1 ubiquitina ligasa el cual ubiquitina a Nrf2 marcándolo para su degradación por el proteasoma (Kobayashi & Yamamoto 2006; Motohashi & Yamamoto 2004; Zhang 2006; Zhang et al. 2004). Por lo tanto, los niveles de Nrf2 dependen de su tasa de destrucción manteniendo así niveles basales bajos. En condiciones de estrés oxidativo, la interacción entre Keap1 y Nrf2 se ve inhibida, Nrf2 es liberada de su interacción con su proteína reguladora y es libre para translocarse al núcleo donde se asocia con proteínas

pequeñas Maf y es capaz de activar la transcripción génica.

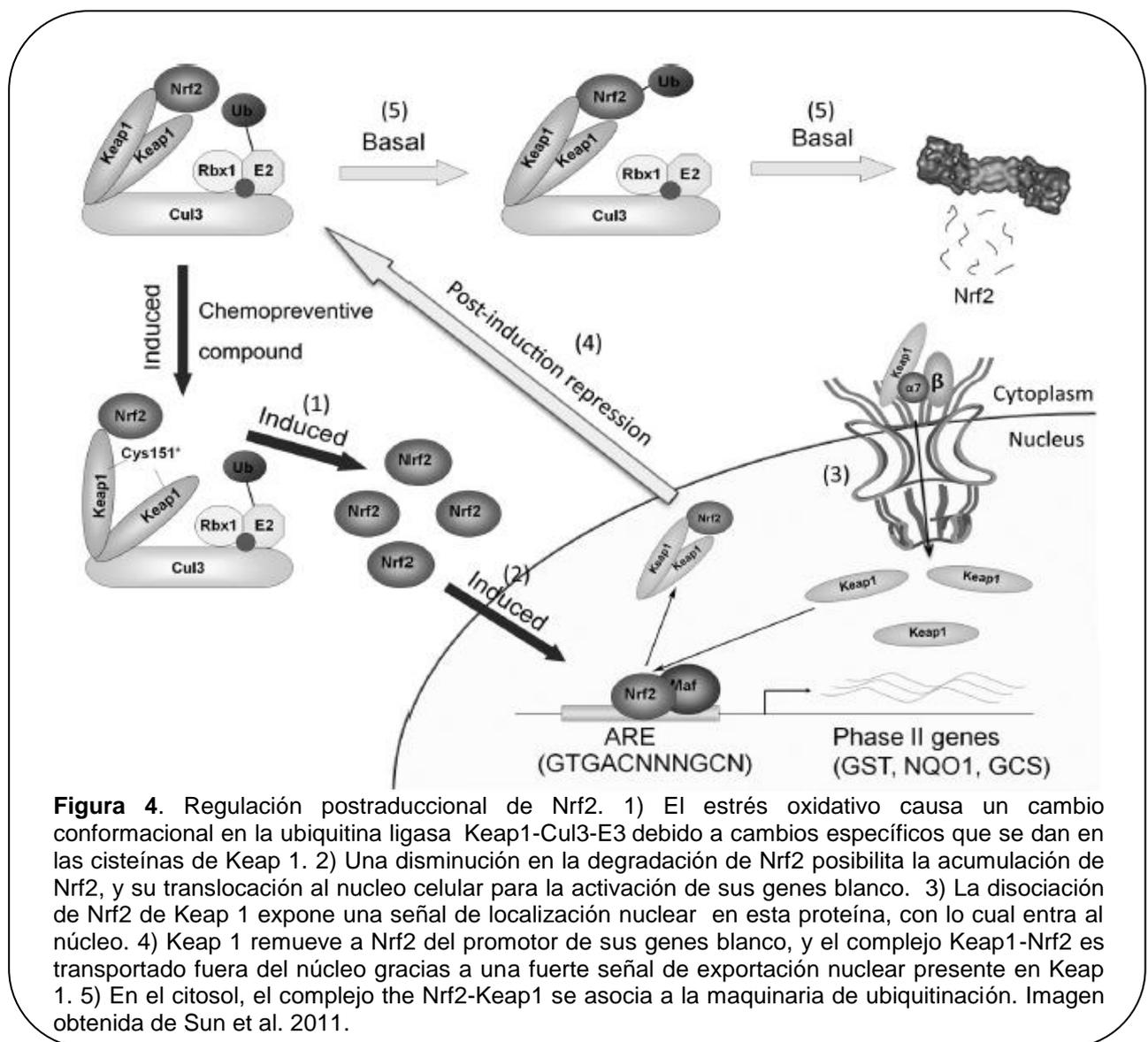
Otro modelo más reciente de la regulación de la actividad de Nrf2 propone que este factor es expresado constitutivamente y directamente translocado al núcleo luego de su síntesis en los ribosomas (Nguyen et al. 2005; Nguyen et al. 2009). De acuerdo con este modelo Keap1 sería translocado de forma independiente al núcleo y es allí donde se daría la interacción entre estas dos proteínas (Nguyen et al. 2009). El hecho de que Nrf2 controle la expresión basal de sus genes implica su presencia en el núcleo en condiciones normales (Itoh et al. 1997; McMahon et al. 2001).

De acuerdo con un tercer modelo, que concilia los dos anteriores, en condiciones normales la interacción entre Keap1 y Nrf2 se daría en el citosol, sin embargo frente al estrés oxidativo, los mismos cambios conformacionales que posibilitarían la disociación de Nrf2 y su subsecuente translocación al núcleo, expondrían una señal de localización nuclear en Keap1 provocando que se transloque al núcleo. Cinéticamente hablando Nrf2 se transporta al núcleo más rápidamente que Keap1, habría por lo tanto una ventana de tiempo en el cual Nrf2 sería capaz de activar la transcripción de sus genes. Una vez en el núcleo, Keap1 removería a Nrf2 de sus genes blanco y el complejo Keap1-Nrf2 es transportado al citosol utilizando una fuerte señal de exportación nuclear presente en Keap1. Una vez en el citosol, el complejo sería reclutado a la maquinaria de ubiquitinación y degradación para restaurar los niveles basales de Nrf2, funcionando así como una especie de interruptor que apagaría la respuesta (Sun et al. 2011) (figura 4).

A su vez, numerosos estudios han demostrado que la fosforilación es un mecanismo plausible para la activación de Nrf2. Se ha demostrado que varias quinasas citosólicas modifican a Nrf2 y potencialmente son capaces de activarlo (Nguyen et al. 2003b; Itoh et al. 2004; Nguyen et al. 2004).

Varios trabajos también indican que la actividad de Nrf2 puede ser regulada al nivel transcripcional. Se identificaron dos elementos en la región proximal 5' a su promotor del gen de Nrf2 llamados ARE-like (AREL), los cuales son necesarios para activar la expresión de Nrf2 en respuesta a un potente activador de este gen, el 3H-1,2-dithiole-3-thione (D3T) (Kwak et al. 2002). Asimismo, se encontró que Nrf2 es capaz de unirse a estos dos elementos y así autoregular su expresión en respuesta a sus activadores. La expresión de Nrf2 a nivel transcripcional también es regulada por AhR (aryl hydrocarbon receptor) un receptor nuclear capaz de inducir una batería de genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos y en funciones endógenas como crecimiento, diferenciación y homeostasis (Miao et al. 2005).

Nrf2 es activado no solo en respuesta a activadores químicos como ROS, RNS y aldehídos lipídicos, sino también frente a agentes exógenos. De hecho, existe una amplia gama de pequeñas moléculas tanto naturales como sintéticas, capaces de inducir potentemente la actividad de Nrf2 (Fahey et al. 1997; Fahey et al. 2001; Rushmore & Kong 2002). Algunos de estos compuestos pertenecen a grupos químicos diversos como los isotiocianatos, 1,2-ditiol-3 tiones, metales pesados, hidroxiperóxidos y los flavonoides como la epigallocatequina galato y la quercetina (Talalay et al. 1995; Talalay 2000; Zheng et al. 2011; Arredondo et al. 2010; Leonardo & Doré 2011).



HO-1

Las evidencias emergentes establecen a la Hemoxigenasa (HO-1) como un mecanismo de defensa fundamental en una gran variedad de tejidos y condiciones (Otterbein & Choi

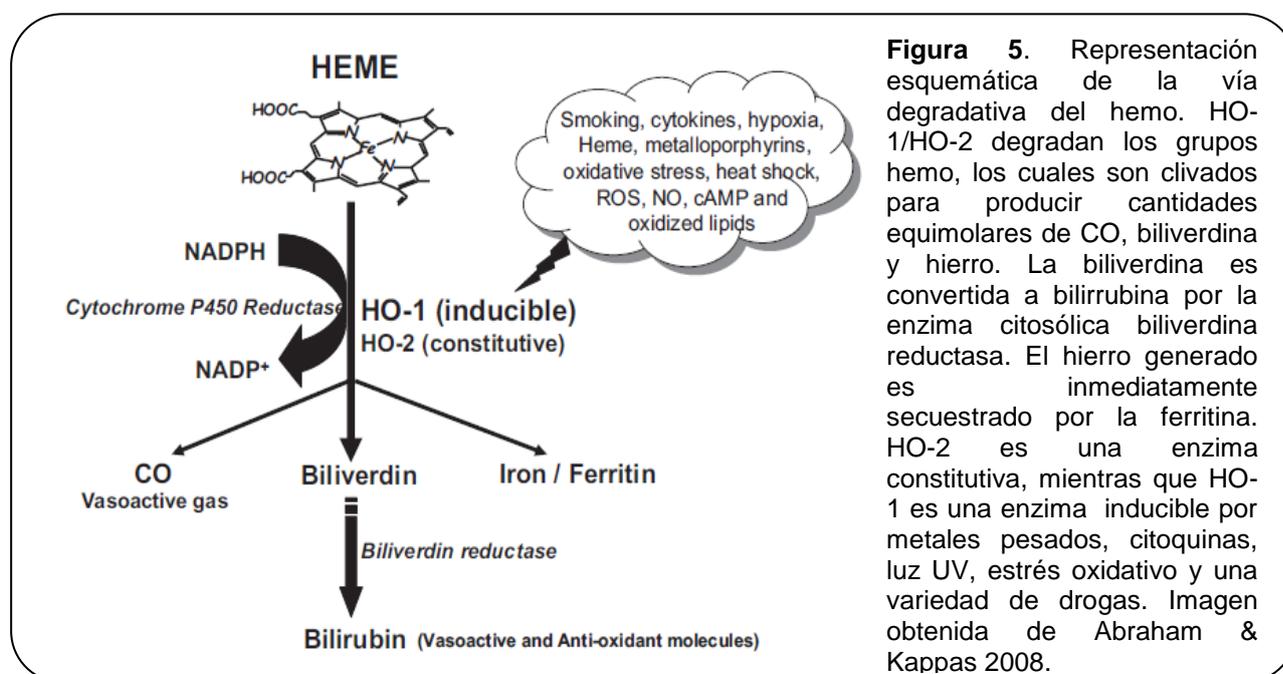
2000) y se ha demostrado que confiere protección tisular y celular en múltiples modelos de injuria pulmonar, injuria vascular, diabetes, isquemia/reperfusión e hipoxia/reoxigenación (Slebos et al. 2003). La mirada de sistemas metabólicos que responden a la inducción de la expresión de HO-1 (Abraham et al. 1996; Abraham et al. 2003; Mingone et al. 2006) dejan ver que el aumentar la actividad de esta proteína, ya sea por medios farmacológicos o genéticos, constituye un posible blanco para el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas que podrían afectar el curso de numerosos procesos patológicos en humanos. En el cerebro, el sistema HO-1 es muy activo y su modulación juega un rol crucial en la patogénesis de diversos insultos oxidativos y desórdenes neurodegenerativos. De hecho, se ha demostrado que esta proteína confiere protección a neuronas expuestas a un daño oxidativo (Chen et al. 2000; Le et al. 1999). Se considera que la inducción de HO-1 contrarresta el daño oxidativo, confiere citoprotección y promueve la supervivencia celular (Ryter et al. 2006; Gozzelino et al. 2010).

La HO-1 es una enzima inducible, ubicua y sensible al estado redox, que se expresa en respuesta a una amplia variedad de estímulos endógenos vinculados al estrés oxidativo e inflamación, incluyendo óxido nítrico, endotoxinas y citoquinas proinflamatorias, lo que lo hace uno de los genes más ubicuamente inducidos (Otterbein & Choi 2000; Ryter et al. 2002). La expresión de HO-1 es inducida, además, por una variedad de factores exógenos como la hemina, metales pesados, xenobióticos, metaloporfirinas, peróxido de hidrógeno y flavonoides como la quercetina (Motterlini et al. 2000; Turner et al. 1999; Nakamura et al. 2011; Matsushima et al. 2009; Chow et al. 2005).

El gen de HO-1 es regulado por el estado redox celular y modulado por factores de transcripción sensibles al estado redox que reconocen sitios de unión específicos en el promotor de este gen, como son activador proteín-1 (AP-1), nuclear factor-kB (NFkB), y Nrf2 (Alam 2002; Alam & Cook 2003; Poon et al. 2004). La expresión del gen de HO-1 es regulada de acuerdo al estado redox de la célula, y depende de la presencia de dos enhancer E1 y E2 en la región promotora del gen (Sun et al. 2002). Ambos enhancers contienen múltiples elementos reguladores como el elemento Heat Shock, el elemento regulador de metales y el elemento de respuesta antioxidantes (ARE) al cual se une el dímero de una proteína Nrf2 y una de las pequeñas proteínas Maf (Stewart et al. 2003). Existen represores que se unen a este elemento para evitar la activación inespecífica de este gen. Uno de ellos es Bach1, un represor transcripcional con la capacidad de unirse al ADN, y que es regulado negativamente por la unión con un grupo hemo. Por lo tanto, la expresión del gen HO-1 es regulada por medio de las interacciones antagónicas de activadores transcripcionales, como Nrf2, y de represores transcripcionales, como Bach1. En condiciones fisiológicas normales, la expresión del gen HO-1 es reprimida por

el complejo Bach1/Maf. Niveles aumentados de hemo u otros inductores disocian a Bach1 de los enhancers y permiten que los activadores, como el heterodímero de Nrf2/Maf accedan al promotor del gen HO-1 (Sun et al. 2002). Además, la expresión de HO-1 también parece ser inducida por HIF-1 (Ockaili et al. 2005).

La HO-1 cataliza la degradación oxidativa del hemo, convirtiéndolo en hierro (que es secuestrado por la ferritina), monóxido de carbono y biliverdina, el cual rápidamente es convertido en bilirrubina por la biliverdina reductasa (Motterlini et al. 2002; Jain & Jaiswal 2006) (figura 5). Estas tres moléculas han atraído gran interés debido a su rol en la modulación de las funciones fisiológicas. HO-1 puede ejercer sus efectos protectores a través de múltiples vías que involucran directamente los efectos citoprotectores y antiapoptóticos de CO y los efectos antioxidantes de la bilirrubina y ferritina (Ryter et al. 2002).



Un aspecto de la defensa de HO-1 parece estar conectada estrictamente con las propiedades antioxidantes de la bilirrubina. Recientemente, se ha reportado que la bilirrubina derivada de la actividad de HO-1 es citoprotectora contra el estrés oxidativo *in vitro* (Clark et al. 2000; Foresti et al. 1999), y su capacidad antioxidante aumenta considerablemente a bajas concentraciones de oxígeno. La bilirrubina a bajas concentraciones elimina los ROS *in vitro*, reduciendo así el daño oxidativo y el estrés oxidativo *in vivo* (Stocker et al. 1987). La biliverdina y bilirrubina han demostrado ser protectoras frente a injurias de isquemia y reperusión *in vivo*, así como frente al estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno *in vitro* (Fondevila et al. 2004; Baranano et

al. 2002; Sedlak & Snyder 2004). Otros efectos intracelulares de la bilirrubina que pueden llegar a ser relevantes en situaciones patofisiológicas incluyen una acción inhibitoria sobre la actividad de la proteína quinasa C (Sano et al. 1985) e inhibición de la producción de superóxido por la NADPH oxidasa activada (Kwak et al. 1991).

El monóxido de carbono comúnmente es conocido como tóxico, debido a su alta afinidad por la proteínas que contienen hemo, lo que puede comprometer el transporte de oxígeno a los tejidos (carboxihemoglobina) o puede disminuir la fosforilación oxidativa a nivel celular al unirse a la citocromo c oxidasa (Ahlström et al. 2009). No obstante, el monóxido de carbono ha probado ser una molécula de señalización extraordinaria generada por la célula que es vital en la regulación de la homeostasis celular. En el cerebro, el CO está emergiendo como un mensajero químico que puede influenciar procesos fisiológicos y patológicos. Confiere protección celular en un gran número de condiciones y enfermedades asociadas a la injuria oxidativa e inflamatoria. Bajas dosis de CO exógeno son citoprotectores contra la inflamación, y la apoptosis, en particular luego de incidentes cardiovasculares, rechazo de órganos, y enfermedades autoinmunes (Mottlerlini & Otterbein 2010). El tratamiento con CO también disminuye el volumen de infarto y el daño cerebral en modelos adultos de isquemia cerebral, donde los animales fueron expuestos a CO inmediatamente después de la oclusión de la arteria cerebral media (Zeynalov & Doré 2009; B. Wang et al. 2011). No obstante, los mecanismos celulares involucrados en la neuroprotección inducida por el CO no se conocen por completo.

Efectos de la hipoxia en la expresión génica global

Más allá de estos tres genes, y su posible inducción o no en nuestro modelo, la ocurrencia de eventos hipóxico-isquémicos alteran prácticamente todas las funciones celulares. La respuesta celular a la hipoxia se caracteriza por una cascada compleja y multifacética de eventos fisiológicos y bioquímicos, lo que implica la regulación coordinada de la expresión de un gran número de genes con funciones diversas, Como consecuencia del fallo energético primario, las células tratan de minimizar el daño al disminuir la demanda energética. Esta respuesta neuroprotectora determina una supresión de procesos no esenciales que consumen energía. Esto incluye apagar y/o reducir temporalmente la capacidad proliferativa de las células, la transcripción génica y la síntesis proteica (White et al. 2000; Hochachka & Lutz 2001). A largo plazo, una segunda respuesta es inducida, que depende principalmente de la modulación de la expresión génica que lleva a la muerte celular, así como de la inducción de vías que promueven la supervivencia celular. En su conjunto, estos eventos a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional determinan el destino del tejido afectado.



Frente a esta realidad, resultan pertinentes los estudios de abordaje transcriptómico y proteómico y la obtención de los perfiles de expresión de las células para comparar la expresión proteica de los tejidos en normoxia e hipoxia y así identificar proteínas que se expresen de forma alterada y que puedan representar nuevos marcadores. Los estudios a gran escala que analizan los cambios de expresión génica a nivel de transcriptoma y/o proteoma han llevado a la identificación de genes y familias génicas, que previamente no habían sido vinculadas a la patología hipóxico-isquémico. La utilidad práctica de los resultados obtenidos con la proteómica en relación con la salud está cobrando gran importancia. El descubrimiento de marcadores proteicos de enfermedades como las cardiovasculares, las neurológicas, las oncológicas, las metabólicas, entre otras, tiene una aplicación clínica en un futuro próximo en el diagnóstico, el seguimiento y el tratamiento de estas enfermedades (Van Elzen et al. 2008).

Al observar los estudios "ómicos" llevados a cabo en modelos de privación de oxígeno a nivel del SNC, la mayor parte del conocimiento y de las conclusiones se basan en datos de transcriptómica (94%), mientras que los datos a nivel proteómico son escasos (9.5%). Se ha observado que los datos obtenidos a nivel del ARNm y a nivel proteico suelen ser contradictorios, lo cual puede adjudicarse a la diversidad en cuanto a los diseños experimentales y su variabilidad intrínseca. Si bien, la técnica de Electroforesis bidimensional ha sido ampliamente utilizada en neurociencia para el estudio del perfil proteico y análisis de expresión proteica diferencial, pocos grupos han reportado datos obtenidos con esta técnica en relación a la hipoxia/isquemia cerebral. A su vez, la mayoría de los estudios se han enfocado en las consecuencias de injurias del tipo isquémicas (Van Elzen et al. 2008).

En este contexto nuestro trabajo propone identificar cambios en los niveles de HIF-1 α , HO-1 y Nrf2 frente a la hipoxia, y en respuesta a un preparado nanosomal de quercetina administrado inmediatamente después de una hipoxia severa. Complementariamente, en el entendido de que numerosas otras proteínas se afectan durante la hipoxia-reoxigenación y las mismas deben ser afectadas por el preparado de quercetina siendo base de la neuroprotección in vivo, se entendió que explorar este perfil molecular marca un camino relevante para el conocimiento de la hipoxia-reoxigenación en el recién nacido e indica vías de señalización de relevancia para la búsqueda de estrategias terapéuticas eficaces en esta compleja enfermedad.

Objetivos

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto multidisciplinario impulsado por el Departamento de Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y el Departamento de Neonatología del Hospital de Clínicas. Dicho proyecto propone llevar a cabo la caracterización de un modelo de hipoxia en cerdos recién nacidos, así como la realización de los estudios preclínicos para evaluar la eficacia como protector cerebral de una preparación nanosomal de quercetina.

En el marco de este proyecto la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias colabora con la caracterización molecular de este modelo.

Objetivo general

En este trabajo, nos proponemos contribuir a la caracterización de los cambios en expresión génica como resultado del daño hipóxico causado por la asfixia perinatal severa en modelo de cerdo recién nacido, así como los cambios en expresión tras el tratamiento con quercetina, con el fin de contribuir al diagnóstico de la eficacia de la terapia neuroprotectora con quercetina, ahondar en los mecanismos de acción del tratamiento propuesto y encontrar blancos moleculares que funcionen como adecuados marcadores del daño y/o de la recuperación.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos nos proponemos analizar los cambios en la expresión tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteínas de HIF-1 α , Nrf2 y HO-1, tres proteínas vinculadas a la citoprotección y neuroprotección frente a diversos tipos de lesión, incluida la hipoxia, pero que además poseen antecedentes que indican que la quercetina podría afectar su expresión.

A su vez, nos proponemos caracterizar los cambios en el perfil proteico global como resultado del daño hipóxico, así como tras el tratamiento con quercetina.

Materiales y Métodos

La estrategia general seguida consta de dos etapas. Una primera etapa que corresponde al protocolo de asfixia perinatal monitoreada, con o sin inyección del preparado nanosomal de quercetina y una segunda etapa que comprende el análisis molecular de las muestras de cerebro obtenidas. Los grupos experimentales incluyen: cerdos sometidos a hipoxia sin administración del preparado de quercetina, cerdos que recibirán el mismo a una dosis de 10mg/kg luego de la hipoxia, y en el caso de la corteza cerdos control o "Sham" que son sometidos a los mismos procedimientos que los primeros dos grupos, pero no son sometidos a hipoxia ni reciben tratamiento con el preparado de quercetina. La segunda etapa consiste en la obtención de cerebros de los animales experimentales, extracción de ARN y proteínas, y el análisis de los mismos mediante tres metodologías diferentes: PCR en Tiempo Real, Western Blot, y Electroforesis Bidimensional. A continuación se presenta un esquema representativo de la estrategia experimental realizada (figura 6).

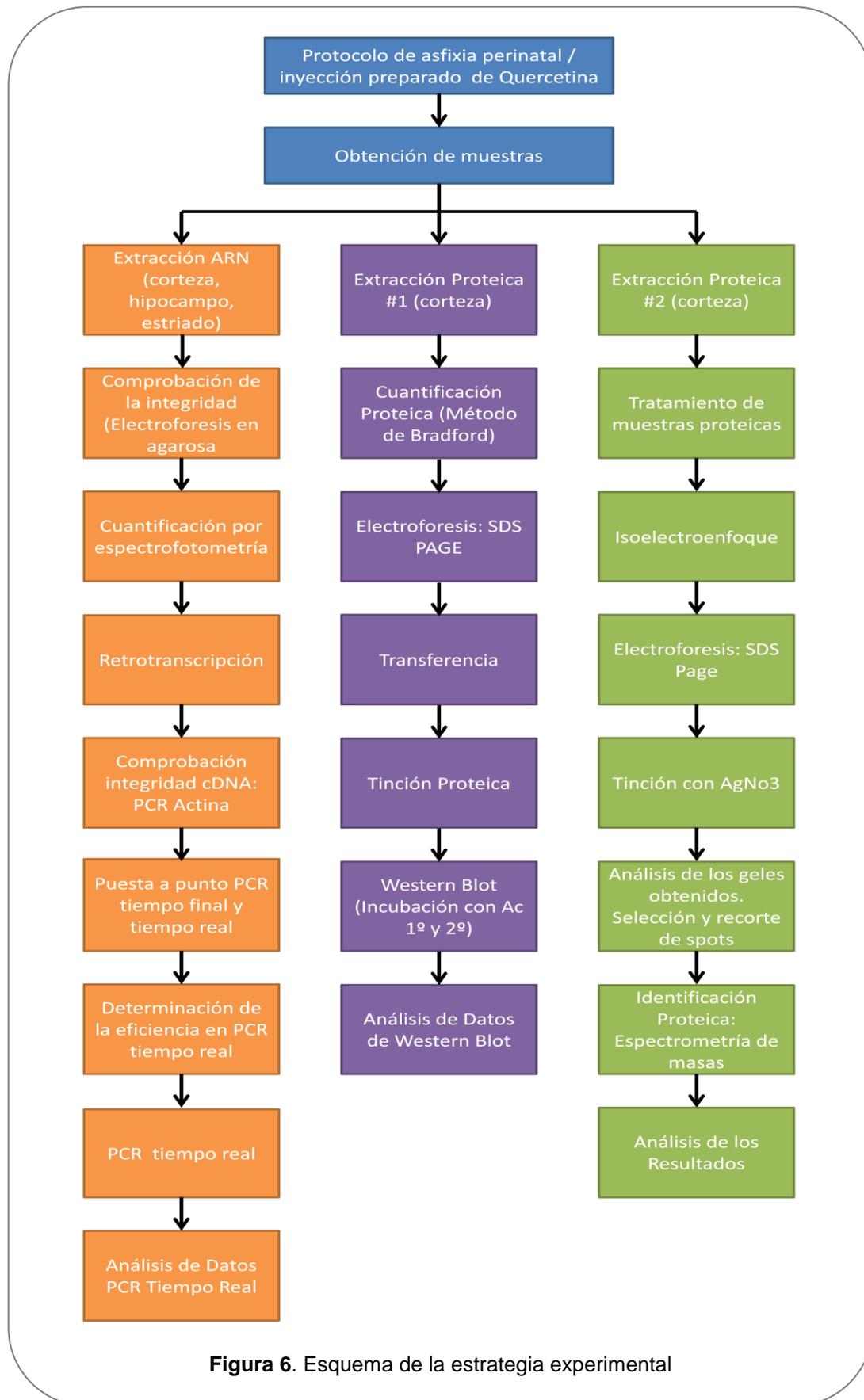


Figura 6. Esquema de la estrategia experimental

Protocolo de asfixia perinatal monitoreada, con o sin inyección del preparado nanosomal de quercetina

Esta etapa es realizada en el Depto. De Neonatología del Hospital de Clínicas por el equipo de la Dra. Fernanda Blasina, co-orientadora de este trabajo. El estudio se realizó siguiendo los principios éticos que regulan la experimentación animal determinados por la Declaración de Helsinki y la Sociedad Americana de Fisiología.

Se utilizan cerdos recién nacidos entre 1 y 3 días de vida (*Sus scrofa domestica*) con peso aproximado 1500 g obtenidos de criadero local. La inducción anestésica se realiza con Ketamina i/m 30/mg/kg y al obtener vía venosa periférica se logra el mantenimiento anestésico con Ketamina, Midazolam y Fentanyl en infusión continua.

Posteriormente se inicia monitorización continua de saturación de oxígeno por oximetría de pulso y electrocardiográfica con electrodos en miembros superiores y miembro inferior izquierdo (derivada D2). A continuación se realiza intubación por traqueostomía e inicio de ventilación mecánica. Se coloca un catéter en la arteria femoral izquierda para registro de presión sistémica invasiva. Se coloca grueso acceso venoso en vena yugular externa para administración de fármacos. Por último, se coloca un catéter en arteria pulmonar común por toracotomía.

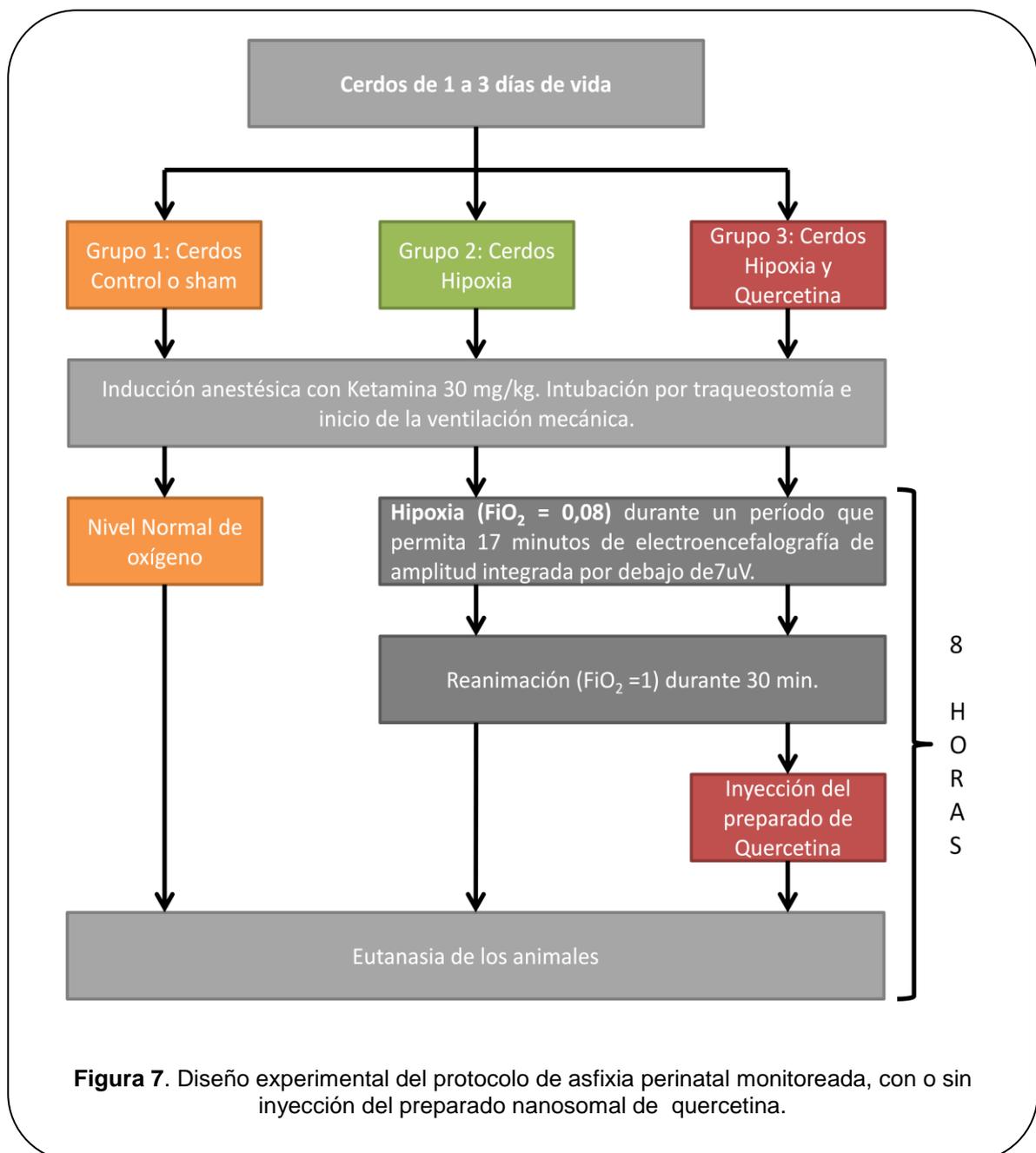
Las variables hemodinámicas registradas durante el transcurso del experimento son: presión arterial sistémica (PAS), frecuencia cardíaca, oximetría de pulso (SatO₂), gasto cardíaco (GC), temperatura corporal central. La temperatura corporal se mantiene entre 38^o5 y 39^o5 C mediante cuna térmica y calefactor con cobertor acrílico sobre el animal.

En el caso de los animales sometidos a hipoxia son sometidos a hipoxia (FiO₂ 0,08) durante un período que permita 17 minutos de electroencefalografía de amplitud integrada por debajo de 7uV, mientras mantenga la frecuencia cardíaca (FC) por encima de 80 y la presión arterial sistémica media (PASm) por encima de 20 mmHg, lo que indicará el momento de reanimación con FiO₂ 1 por 30 minutos.

En el caso de los animales tratados con el preparado nanosomal, después de la reanimación y una vez estabilizado el preparado se realizará infusión del vehículo y posteriormente del preparado nanosomal de Quercetina (mezcla de Quercetina con ciclodextrina en etanol, permitiendo la formación de los complejos a los que se adiciona lecitina y el colesterol) durante 1 hora, por acceso venoso periférico. Esta mezcla de los componentes, hecha en etanol, se inyecta en una solución de suero fisiológico, y la preparación final tendrá una concentración de Quercetina de 2mg/ml.

Tras el tiempo indicado de sobrevida (8 horas desde el inicio de la hipoxia) el animal es sacrificado y se extrae el cerebro y varias áreas disecadas son congeladas en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento en Freezer -80°C .

En la figura 7 se muestra un esquema del diseño experimental del protocolo de asfixia perinatal monitoreada, con o sin inyección del preparado nanosomal de quercetina.



Por simplicidad, de aquí en adelante nos referiremos a los cerdos del grupo 1 como cerdos sham, a los cerdos del grupo 2 como cerdos hipóxicos, y a los cerdos del grupo 3 como cerdos H+Q.

Análisis molecular de los cambios en expresión génica

Obtención de muestras de tejido

Para el análisis molecular que realizamos en la Sección Genética de la Facultad de Ciencias, conservamos un hemiserebro, del cual se disecan diferentes regiones (corteza, hipocampo, cerebelo y estriado). Se rotulan por separado, se congelan en nitrógeno líquido y se transfieren a -80°C hasta su utilización.

Las muestras se dividen en 2 grupos experimentales: aquellos sometidos únicamente a hipoxia, y aquellos sometidos a hipoxia y tratados posteriormente con el preparado de quercetina. En el caso de las muestras de corteza existe un tercer grupo experimental: los cerdos control o sham.

Las muestras de tejido cerebral obtenido son utilizadas para determinar cambios de expresión a nivel de ARNm mediante Retrotranscripción y PCR en tiempo Real, y a nivel proteico mediante Western Blot. Asimismo, muestras de corteza de animales especialmente seleccionados, fueron utilizadas para Electroforesis Bidimensional para el análisis proteómico.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total de las muestras de corteza, hipocampo y estriado se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido. La extracción se realizó con el Kit comercial ilustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit de General Electric. El protocolo seguido se detalla en el Anexo. El ARN total fue eluído en 40 μl de H_2O RNAsa free, y una segunda elusión en 20 μl , y conservado a -80°C . La extracción de ARN tal como se describe aquí se utilizó para un número de muestras de cada área según figura en la tabla 1.

Tabla 1. Número de muestras de cada tratamiento

Tejido	Sham	Hipoxia	H+Q
Corteza	4	6	6
Hipocampo	-	6	6
Estriado	-	5	5

Se separa una fracción de los ARNs extraídos para su cuantificación por Espectrofotometría y para la constatación de su integridad mediante la visualización de las bandas de ARN ribosomal 18S y 28S y la ausencia de ADN genómico mediante electroforesis en agarosa al 1%.

Medición de Concentración de ARN

Los ARNs extraídos son cuantificados por Espectrofotometría (medición de absorción a 260nm) con el equipo Nanodrop 2000 de Thermo Scientific, y a partir de la conocida relación que establece que 1UA equivale a 40 µg/ml.

Retrotranscripción

Se procede a la retrotranscripción de los ARN extraídos utilizando una transcriptasa reversa comercial M-MuLV Reverse Transcriptase de New England Biolabs y tanto OligodT como Random Primers. El protocolo realizado fue el sugerido por el fabricante de la enzima con algunas modificaciones puntuales y se describe en el anexo. En todos los casos se retrotranscribió a partir de 2 µg de ARN molde. Los cDNAs obtenidos se congelan a -20°C hasta su utilización. Se prepara una dilución 1/20 de los cDNA para su utilización en PCR tiempo final y en tiempo real.

Cebadores

Los cebadores utilizados fueron diseñados en nuestro laboratorio para la especie *Sus scrofa domestica* y adquiridos en la empresa IDT (Integrated DNA Technologies). En este trabajo, se realizó el diseño de uno de los juegos de cebadores de HO-1 basado en la secuencia nucleotídica de su ARN mensajero obtenida de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) NM_001004027.1. Los cebadores diseñados fueron analizados mediante la herramienta OligoAnalyzer 3.1 de IDT corroborando la ausencia de especificidad con otros ARN mensajeros mediante un BLAST contra la base de datos del NCBI. En la tabla 2 se detallan los cebadores utilizados tanto en las PCR a tiempo final como en tiempo real.

Tabla 2. Cebadores

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm calculada con IDT	Largo cebador (pb)	Largo amplicón (pb)
HOnFw #2	GCCCCAGGATTTGTCAGAGG	60	20	143
HOnRv #2	TGTGGTACAAGGACGCCATC	60	20	
HIF-1αFw	CCTTGGATGGTTTTGTTATGG	59.2	21	176
HIF-1αRv	GCCATTTCTGTGTGTAAGCAT	57.8	21	
Nrf2 Fw	TCAGCCAGCACAAACACATCCCG	68	22	205
Nrf2Rv	TGG GCT TTC GAC GTG ACT GGG	68	21	
HOFw #1	ATG TGA ATG CAA CCC TGT GAA	62	21	188
HORv #1	GGGAAAGATGCCACAGACTCCT	65	22	
ActinaFw	CCAGCACGATGAAGATCAAG	60	20	179
ActinaRv	CAACTAACAGTCCGCCTAGA	60	20	

PCR Tiempo Final

Se procede a la realización de una PCR a tiempo final de Actina para corroborar la integridad de los cDNAs obtenidos. La técnica de PCR en tiempo final fue, además, utilizada para probar los cebadores diseñados y para obtener las condiciones ideales de reacción para las reacciones de PCR en tiempo real. Para todas las reacciones de PCR en tiempo final se utilizó la enzima comercial Dream Taq DNA polymerase de Thermo Scientific y el termociclador con gradiente Palm-Cycler Gradient Thermal Cycling de Corbett Life Sciences.

En todos los casos el volumen final de reacción fue de 10 μ l y las reacciones se prepararon como se detalla en la tabla 3, variando de acuerdo con el juego de cebadores utilizados la temperatura de hibridación y el volumen utilizado para cada juego de cebadores (10mM) según se detalla en la tabla 4. El modo de ciclado utilizado es el que se detalla en la tabla 5.

Tabla 3. Condiciones de Reacción

Reactivo	Volumen (μ l)
Buffer 10X	1
dNTPs 10 mM de cada uno	0,2
Cebador Directo	Ver tabla 4
Cebador Reverso	Ver tabla 4
Dreamtaq (5U/ μ L)	0,05
cDNA (dilución 1/20)	2
Agua	c.s.p

Tabla 4. Condiciones de reacción para cada par de cebadores

Cebadores (10 μ M)	Volumen (μ l)	Temperatura hibridación ($^{\circ}$ C)
Actina	0.3	55
HO-1 #1	0.6	55
HO-1 #2	0.3	59
Nrf2	0.6	69
HIF-1 α	0.3	49

Tabla 5. Condiciones de ciclado

Etapas	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Repetición
Activación de la enzima	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	20 segundos	30 ciclos
Hibridación	Ver tabla 4	30 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	3 minutos	1

PCR Tiempo Real

La técnica de PCR en tiempo real se realizó utilizando el termociclador de tiempo real Rotor gene 6000 de Corbett Life Sciences y el mix KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal de Kapa Biosystems.

Se realizaron pruebas de puesta a punto, entre las cuales se varió el volumen final de reacción. Se constató que en las condiciones elegidas y con la enzima utilizada, el uso de volúmenes menores a 20 conlleva una pérdida de eficiencia de la reacción. Por ello, en todos los casos el volumen de reacción final fue de 20ul, y se utilizó 10ul de Mix Kapa según lo indica el fabricante, un volumen adecuado de cDNA molde y de cebadores según se determinó en el laboratorio. Se completó el volumen final con el volumen requerido de agua. En la tabla 6 se muestran las condiciones de reacción para cada uno de los juegos de cebadores utilizados. En el caso de Actina se muestran dos versiones ligeramente diferentes ya que la primera corresponde a las condiciones utilizadas para las muestras de corteza e hipocampo, y la segunda corresponde a las utilizadas en las muestras de estriado. Asimismo, el juego de cebadores N°1 de HO-1 se utilizó en las muestras de corteza e hipocampo, mientras que el juego de cebadores N°2 de HO-1 se utilizó para las muestras de estriado. Respecto al ciclado, en todas las ocasiones se realizaron 40 ciclos de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión. Seguidos por un ciclo de desnaturalización que permitió constatar la temperatura de disociación del amplicón y por lo tanto el carácter específico de la reacción.

Tabla 6. Condiciones de Reacción para cada par de cebadores

Cebadores	Volumen de Cebadores	Volumen Molde (µl)	Ciclado		
			Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Actina	0.6	2	Activación de la enzima	95	10 minutos
			Desnaturalización	95	15 segundos
			Hibridación	55	15 segundos
			Extensión	72	15 segundos
Actina *	0.4	4	Activación de la enzima	95	3 minutos
			Desnaturalización	95	15 segundos
			Hibridación	55	15 segundos
			Extensión	72	15 segundos
HO-1 #1	0.5	2	Activación de la enzima	95	10 minutos
			Desnaturalización	95	15 segundos
			Hibridación	55	15 segundos
			Extensión	72	15 segundos
HO-1 #2	0.3	4	Activación de la enzima	95	3 minutos
			Desnaturalización	95	15 segundos
			Hibridación	59	10 segundos
			Extensión	72	15 segundos
Nrf2	0.6	2	Activación de la enzima	95	10 minutos
			Desnaturalización	95	15 segundos
			Hibridación	69	15 segundos
			Extensión	72	15 segundos

HIF-1 α	0.6	2	Activación de la enzima	95	10 minutos
			Desnaturalización	95	15 segundos
			Hibridación	49	15 segundos
			Extensión	72	15 segundos

Cálculos de eficiencia de Real Time

Para el cálculo de las eficiencias de reacción de cada uno de los genes estudiados, se generó un pool de cDNAs de las muestras que serían utilizadas en real time PCR. Con esta mezcla, se realizaron diluciones seriadas en base 10, en concreto se utilizaron las diluciones 1, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Estas diluciones se utilizaron como molde de PCR en tiempo real para cada uno de los genes tal como se indicó anteriormente. Luego se realizó una curva de los valores de Ct obtenidos en función del logaritmo de la dilución, a partir de cuya pendiente se calculó la eficiencia como: $E=10^{(1-\text{pendiente})}$.

Análisis de Datos Real Time

Los resultados son analizados mediante un software adecuado, el programa REST (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl et al. 2002). El software REST es una herramienta para el análisis de datos de expresión génica provenientes de experimentos de PCR en tiempo real cuantitativos. El análisis o cuantificación de la expresión génica relativa realizado por este software utiliza la expresión de genes de referencia para normalizar los niveles de expresión del gen de interés en las diferentes muestras, compensando así por las variaciones debido a diferencias en la carga y manipulación de las muestras. En nuestro caso, el gen de actina fue utilizado como gen de referencia. Además, este software aplica un modelo matemático que toma en cuenta las diferentes eficiencias de reacción tanto del gen de interés como el gen de referencia. Este programa utiliza la siguiente ecuación para el cálculo de la expresión relativa de los genes (Pfaffl et al. 2001).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Donde E_{target} representa la eficiencia de reacción del gen de interés, E_{ref} representa la eficiencia de reacción del gen de referencia, $\Delta CP_{\text{target}}$ representa la diferencia de CP para el gen de interés entre la situación control y la situación problema y ΔCP_{ref} representa la diferencia de CP para el gen de referencia entre la situación control y la situación problema. Ct y CP son dos términos equivalentes para referirse al ciclo en cual la fluorescencia supera un valor umbral o "threshold".

A su vez, este software utiliza un método de “randomización” y bootstrapping integrados para definir la significancia estadística de los valores de expresión relativa calculados, considerando $p < 0.05$ como significativo. Este test de randomización llamado Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test toma repetidamente y al azar, datos de Cp del gen de referencia y del gen de interés, realocándolos entre las muestras control y tratadas y para cada uno calcula la expresión relativa. Se realizan 2000 realocaciones y en base a la proporción de valores de expresión relativa calculadas y al valor de expresión relativa de nuestros datos es que calcula el valor P, utilizando la hipótesis nula de que el tratamiento no tiene efecto, y que las diferencias observadas se deben solo al azar.

Electroforesis en agarosa

La electroforesis en agarosa se utilizó para la constatación de la integridad de los ARN extraídos, y también para correr los productos de PCR para Nrf2 en tiempo final y purificar la banda para su secuenciación. Para ello se prepararon y se corrieron geles de agarosa al 1% según el protocolo detallado en el anexo.

Electroforesis en poliacrilamida

Todos los productos de PCR tanto en tiempo final como en tiempo real fueron corridos en gel de poliacrilamida al 6% (TBE1X, Acrilamida 6%, APS 0.1%, Temed 0.1%) para corroborar la presencia de una única banda. Para ello se prepararon y se corrieron geles de poliacrilamida al 6% según el protocolo detallado en el anexo.

Purificación de ADN a partir de agarosa

La purificación de la banda correspondiente al amplicón de Nrf2 a partir de un gel de agarosa para su posterior secuenciación fue realizada con el kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit de Amersham Biosciences cuyo protocolo se adjunta en el anexo.

Secuenciación

La banda purificada correspondiente al amplicón de Nrf2 fue secuenciada en el servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo con el secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems).

Extracción proteica: protocolo 1

Este protocolo fue utilizado para la extracción proteica de muestras de corteza cerebral para su utilización en la técnica de Western Blot. Se extrajeron 6 muestras de corteza de cada uno de los grupos experimentales.

El protocolo consiste en homogeneizar aproximadamente 50 mg de tejido en Urea Cracking Buffer (10mM), PMSF (1mM), β -mercaptoetanol (1%) + cocktail inhibidor de proteasas de Sigma Aldrich # catálogo P2714 (1%) con homogeneizador a pila (aproximadamente 200 μ l). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó 20 minutos a velocidad máxima a temperatura ambiente. El sobrenadante, es transferido a un nuevo tubo eppendorf cuidando de no traspasar pellet si los hubiese. Las proteínas extraídas se almacenan a -20°C hasta su utilización.

Extracción proteica: protocolo 2

Este protocolo fue utilizado para la extracción proteica de muestras de corteza cerebral para su utilización en la técnica de Electroforesis Bidimensional. Se extrajeron 2 muestras de corteza de cada uno de los grupos experimentales.

El protocolo consiste en homogeneizar y lisar aproximadamente 50mg de tejido en buffer de lisis (40 mM Tris base, 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 1mM PMSF, 1% cocktail inhibidor de proteasas de Sigma Aldrich #catálogo P2714). Agitar por vortex durante 1-2 min, incubar 30 min a temperatura ambiente con leve agitación para permitir completar la lisis, centrifugar 30 min a 13.000 g, y transferir el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Conservar el lisado a -20°C .

Para las muestras que fueron utilizadas para electroforesis bidimensional fue necesario un paso adicional de limpieza de las muestras proteicas que fue realizada con el kit comercial GE Healthcare 2D Clean Up Kit. El protocolo seguido fue el recomendado por el fabricante, que se detalla en el anexo.

Fraccionamiento Proteico

Con el fin de obtener fracciones proteicas citoplasmáticas y nucleares de buena calidad se probaron dos protocolos de fraccionamiento diferentes. El primero de ellos es un protocolo extraído del trabajo de Ramsey et al. 2007 y se adjunta en el anexo. El segundo protocolo de fraccionamiento se realizó con el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents de Thermo Scientifics que también se adjunta en el anexo.

Cuantificación Proteica

Para realizar la cuantificación de proteínas en los extractos proteicos obtenidos se utilizó el reactivo de Bradford midiendo la absorbancia a 595 nm. Las diluciones utilizadas en la cuantificación fueron 1/20 y 1/10 en el caso de las proteínas extraídas según el protocolo de extracción 1, y 1/40 y 1/30 en el caso de las proteínas extraídas según el protocolo de extracción 2. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, utilizando un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida. Los pasos seguidos fueron: 1) Sembrar por duplicado en la placa 5 ul de diluciones seriadas de BSA (0,12-0,25-0,50-0,75-1,00-1,25-1,50 ug/ul), 2) Sembrar por duplicado 5 ul de diluciones 1/10 y 1/20 de la muestra a cuantificar, 3) Agregar a cada pocillo 150 ul de reactivo Bradford e incubar a temperatura ambiente durante 10-15 min y 4) Realizar la lectura de la placa en espectrofotómetro a 595 nm.

Electroforesis de Proteínas

Para la electroforesis proteica previa al Western Blot se preparó un gel separador al 12% (acrilamida 12%, Tris 0,375M pH 8.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, Temed 0.05%) y el gel concentrador 3.75% (acrilamida 3.75%, Tris 0,126M pH 6.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, Temed 0.05%). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10–230 kDa) P7711S de New England Biolabs y Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Markers High Molecular Weight range (14300-220000 Da) de Amersham Biosciences de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El protocolo seguido para la corrida electroforética se detalla en el anexo.

Transferencia

La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se realiza mediante electrotransferencia utilizando membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond ECL de GE Healthcare Life Sciences y la cuba de transferencia TE 22 Mini Tank Transfer Unit de GE Healthcare Life Sciences. Una vez finalizada la corrida electroforética se equilibra el gel y se humedece la membrana en buffer de transferencia (Tris-glicina 1X, etanol 12%, SDS 0,025%) durante 20 minutos. El armado del cassette de transferencia se realiza de la siguiente manera: polo negativo, 1 esponja gruesa, 1 whatman, gel, membrana, 1 whatman, 1 esponja gruesa, polo positivo. La Transferencia se realiza durante 1h 45 min a 300mA y 100V.

Visualización de proteínas

Una vez finalizada la transferencia se procede a la evaluación de la misma mediante la tinción con Solución de Rojo Ponceau (Rojo ponceau 0.005g/mL, ácido acético 1%) de la membrana y con Solución de Azul de Coomassie (Azul de Coomassie 2.5g/L, etanol 45%, ácido acético 10%) para el gel. De esta forma, se puede determinar una buena transferencia mediante la presencia de proteínas en la membrana y la ausencia de proteínas en el gel.

Western Blot

Durante la puesta a punto de esta técnica se ensayaron diversas soluciones. Entre otras, se probaron soluciones salinas basadas en PBS, y otras con TBS. Se optó por trabajar sobre la base de solución salina con Tris (TBS) como se describe a continuación.

Se procede a bloquear la membrana con TBS-leche descremada 5% durante 1 hora a temperatura ambiente u overnight a 4°C. Luego del bloqueo se enjuaga rápidamente 2 veces con TBS-Tween 20 (0,05%), y una vez con TBS (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5). Con la membrana bloqueada y lavada se procede a la incubación con una dilución apropiada de anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con agitación suave. El anticuerpo es diluido en TBS-Tween20(0,05%)-BSA(3%). Luego de la incubación con anticuerpo primario se enjuaga 1X5 min y 2X10min con TBS-Tween 20 (0.05%) con agitación fuerte. La incubación con anticuerpo secundario conjugado a Horseradish peroxidase se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la incubación con anticuerpo secundario se enjuaga 1X5 min y 2X10min con TBS-Tween 20 (0.05%) con agitación fuerte, y se hace un lavado extra con TBS como para remover el Tween. Luego se procede a exponer la membrana a un substrato quimioluminiscente comercial durante 5 minutos. El substrato utilizado fue SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce Protein Biology Products de Thermo Scientific. Luego de lo cual es visualizado ya sea por técnicas tradicionales de revelado como mediante el uso de equipos especializados como G-Box Chemi XX6 de Syngene. Los anticuerpos y diluciones utilizadas se muestran en la tabla 6.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados

Proteína	Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
Nrf2	α-Nrf2 ab53019 Abcam	1/100	α- rabbit IgG	1/5000
	α-Nrf2 ab894443 Abcam	1/1000		
HO-1	α-HO-1 ADI-SPA-895 Enzo Life Sciences	1/1000		
HIF-1α	α-HIF-1α Ab4 Thermo Scientific	1/100	α- mouse IgG	1/5000
Tubulina	α-beta tubulin de Amersham International	1/400	α- mouse IgG	1/5000

Electroforesis Bidimensional: Isoelectroenfoque (1ª Dimensión)

Las condiciones de corrida de la primera dimensión dependen del pH de la tira (strip) y del tamaño de ésta. En nuestro caso empleamos tiras Immobiline DryStrip de GE Healthcare con un rango de pH 3-10 no lineal y de 7 cm de largo.

El primer paso consistió en diluir un volumen equivalente a 200ug de proteína en 125 μ l de buffer de rehidratación (urea 8M, CHAPS 2%, 0,002% azul de bromofenol). En el momento de cargar la muestra se añaden DTT 2.8 mg/ml (0,28%) y anfolitos del pH de la tira al 0.5%. Se coloca la muestra en el recipiente (holder) para la tira esparciendo la muestra desde un extremo al otro. Se sacan las tiras del congelador, se les retira el soporte plástico y se las deposita con el gel hacia abajo encima de la muestra evitando la formación de burbujas. Luego se añade 300 μ L de aceite mineral hasta recubrir toda la tira de para que la muestra no se evapore, y se coloca la tapa al recipiente. Luego se coloca el recipiente con las muestras en el aparato de isoelectroenfoque con los electrodos correctamente colocados. El equipo de isoelectroenfoque utilizado fue Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System de GE Healthcare.

A continuación se detalla el programa empleado para resolver proteínas totales de cerdo:

1. 12 horas de rehidratación a 20°C y 50uA/strip
2. 30 minutos a 150V en gradiente
3. 1 hora a 300V en etapas (Step and Hold)
4. 30 minutos a 1000V en gradiente
5. 1 hora a 1000V en etapas (Step and Hold)
6. 1 hora y 30 minutos a 5000V en gradiente
7. 6 horas a 5000V en etapas (Step and Hold)

Cuando el programa finaliza, se retiran las tiras del holder con una pinza y se colocan en tubos adecuados y rotulados. Se almacenan a -80° hasta realizar la segunda dimensión.

Electroforesis Bidimensional: Electroforesis (2ª Dimensión)

Para realizar la segunda dimensión se preparan geles de poliacrilamida al 12% como se describió anteriormente, pero en esta ocasión los geles no llevan la fracción de gel concentrador. Se vierte con pipeta la mezcla al 12% entre los vidrios previamente ensamblados hasta dejar en la parte superior una franja de aproximadamente 1 cm de ancho sin rellenar donde se coloca agua y se deja polimerizar a temperatura ambiente.

Para realizar la segunda dimensión se procedió de la siguiente manera: 1) Se sacan las

tiras del congelador, 2) Se incuba 15 min a temperatura ambiente con leve agitación en buffer de equilibración (Urea 6M, Tris-HCl pH 8,8 75mM, Glicerol 29,3%, 0,002% azul de bromofenol) más DTT 1% (50 μ L/mL), 3) Se pasa la tira a un nuevo tubo con buffer de equilibración más Iodoacetamida (25 mg/ml) y se incuba 15 min en iguales condiciones, 4) Se coloca la tira ya equilibrada manipulándola cuidadosamente con pinzas, sobre el gel de poliacrilamida. En uno de los extremos se coloca un papelito de filtro con 3 μ l de marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus #SM1811 Fermentas Life Sciences. Se ajusta la tira al borde del gel y se sella con solución de agarosa al 0.5% en buffer de corrida y 0,002% azul de bromofenol. 5) Se realiza la corrida a 25 mA/gel a baja temperatura durante 2 horas, hasta que el frente de corrida alcance la parte baja del gel sin salirse, 6) Tras la corrida, se desmontan los geles y se procede a su fijación y tinción.

Visualización: Tinción con nitrato de plata

Para la tinción de proteínas con nitrato de plata se siguió el protocolo detallado en el anexo, que consta de fijación en solución de Fijación (12% Acido Acético, 50% Etanol, 0.5 ml/L Formaldehído 37%), enjuague con solución de tiosulfato (0.2 g/L Na₂S₂O₃.5H₂O), incubación con solución de nitrato de plata (2g/L AgNO₃, 0,75 ml/L Formaldehído 37%) e incubación con solución de revelado (30 g/L Na₂CO₃, 20 ml/L solución Tiosulfato, 0,5 ml/L Formaldehído 37%). Dicha técnica es compatible con el análisis posterior por espectrometría de masa.

Análisis de geles y aislamiento de manchas proteicas

Para proceder al análisis de los geles es necesario obtener una imagen de buena calidad utilizando un scanner apropiado, para ello se utilizó el imageScanner de General Electric. Se procedió al análisis de las imágenes, y se cuantificó la intensidad de los spots proteicos con el Software ImageJ.

Tras el análisis de las imágenes, se procedió a la escisión en el gel de los spots correspondientes a proteínas de interés, colocando los geles sobre una superficie limpia y cortando la región del gel alrededor de la mancha con un bisturí. Se coloca el trozo escindido dentro de un eppendorf rotulado, y se señala la región escindida en una imagen del gel con el mismo rótulo.

Análisis por espectrometría de masa

Esta etapa consiste en la Identificación de una proteína por mapeo peptídico con tripsina



y medida por MALDI-TOF, incluyendo los MS/MS, y fue realizado por Madelón Portela del Servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica.

Resultados

Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de las muestras propuestas. En todos los casos se verificó la integridad de los ARNs extraídos mediante electroforesis. En la figura 8 se muestra a modo de ejemplo la imagen de un gel de agarosa donde se corrieron algunos de los ARN extraídos, y donde se puede observar la integridad de los mismos por la presencia de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, y se puede constatar la ausencia de ADN genómico.

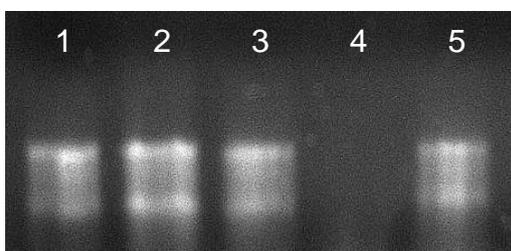


Figura 8. Ejemplo de comprobación de la integridad de los ARN extraídos. Carril 1: Corteza Sham. Carril 2: Hipocampo H+Q. Carril 3: Estriado H+Q. Carril 5: Estriado Hipoxia.

Luego de la retrotranscripción de los ARNs se procedió a verificar la presencia y estado de los cDNA mediante una PCR en tiempo final con cebadores de Actina y la visualización del amplicón mediante electroforesis en poliacrilamida. En todos los casos se pudo constatar la calidad del cDNA, y la ausencia inhibidores, dado que se obtuvo el amplicón esperado. En la figura 9 se puede observar uno de los geles de poliacrilamida donde se evidencia una única banda correspondiente al amplicón de Actina de 179 bp.

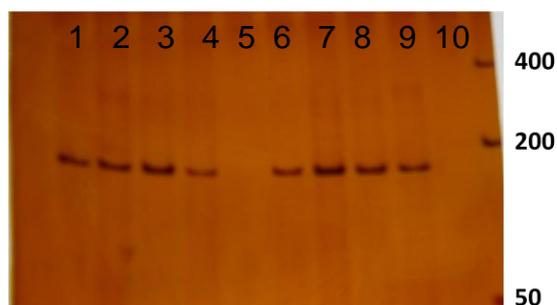
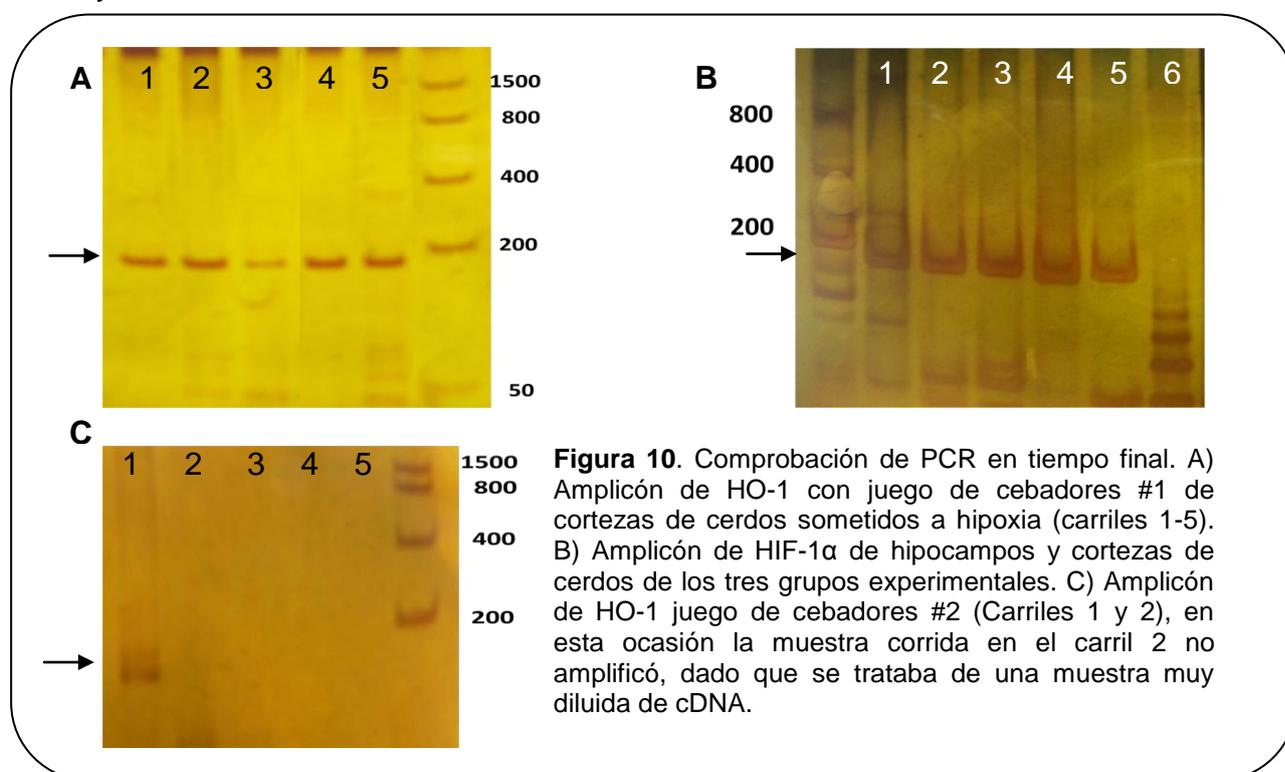


Figura 9. Comprobación de la integridad de los cDNA: Electroforesis en poliacrilamida donde se corrieron productos de PCR en tiempo final de Actina (carriles 1-4 cerdos sometidos a hipoxia, carriles 6-9 cerdos sometidos a hipoxia y tratados con quercetina).

Puesta a punto de las reacciones de PCR

Por otro lado, se realizó la puesta a punto de las distintas PCR, primero a tiempo final y luego en tiempo real obteniéndose las condiciones adecuadas (citadas previamente en

materiales y métodos), para cada uno de los genes, que permiten la obtención de una única banda, visualizada mediante gel de poliacrilamida. El factor que más variamos en la puesta a punto de PCR en tiempo final fue la temperatura de hibridación, en todos los casos se partió de temperaturas cercanas a la temperatura de disociación (melt) de los cebadores y se fue subiendo progresivamente hasta encontrar la temperatura ideal. Al trasladar las condiciones de reacción del PCR en tiempo final al PCR en tiempo real, en general no fue necesario modificar las condiciones ya preestablecidas, a excepción de la cantidad de cebadores y de la cantidad de cDNA molde en algunos casos puntuales. En el caso de HIF-1 α , HO-1 (con ambos juegos de cebadores) y Actina se logró la obtención de una banda única del largo esperado. En la figura 10 a modo de ejemplo se muestran imágenes de gels de poliacrilamida donde se corrieron los amplicones para HO-1 y HIF-1 α .



Sin embargo, este no fue el caso de Nrf2. Al correr los productos de PCR de Nrf2 en un gel de poliacrilamida (como se muestra en la figura 11A) se puede apreciar una banda de menor tamaño (aproximadamente 100 pb) y dos bandas de mayor tamaño (aproximadamente 800 y 1000 pb), además de la banda específica esperada para Nrf2. Al probar diferentes condiciones de reacción que aumenten la astringencia no conseguíamos eliminar esas bandas inespecíficas, o se perdían todas las bandas. Con lo cual se procedió a correr el producto de las PCR de Nrf2 en geles de agarosa, en los cuales se puede visualizar una única banda del tamaño esperado (figura 11B). Para estar seguros de la identidad del amplicón observado se recortó la banda correspondiente en un gel de agarosa, a partir de la cual se purificó el fragmento y se

envió a secuenciar. La secuencia que se obtuvo es idéntica a la secuencia nucleotídica del ARNm de Nrf2 presente en la base de datos del NCBI para la cual fueron diseñados los cebadores (figura 12A). Con lo cual se concluyó que los cebadores efectivamente amplifican el producto esperado, y que las otras bandas que vemos en la poliacrilamida serían un artefacto de la corrida, y no verdaderos amplicones inespecíficos presentes en grandes cantidades. De hecho, en las curvas de Melt (disociación) de las reacciones de PCR en tiempo real se ve un único pico correspondiente al amplicón de Nrf2, y no se ven otros picos que indiquen la presencia de otros productos de la reacción (figura 12B).

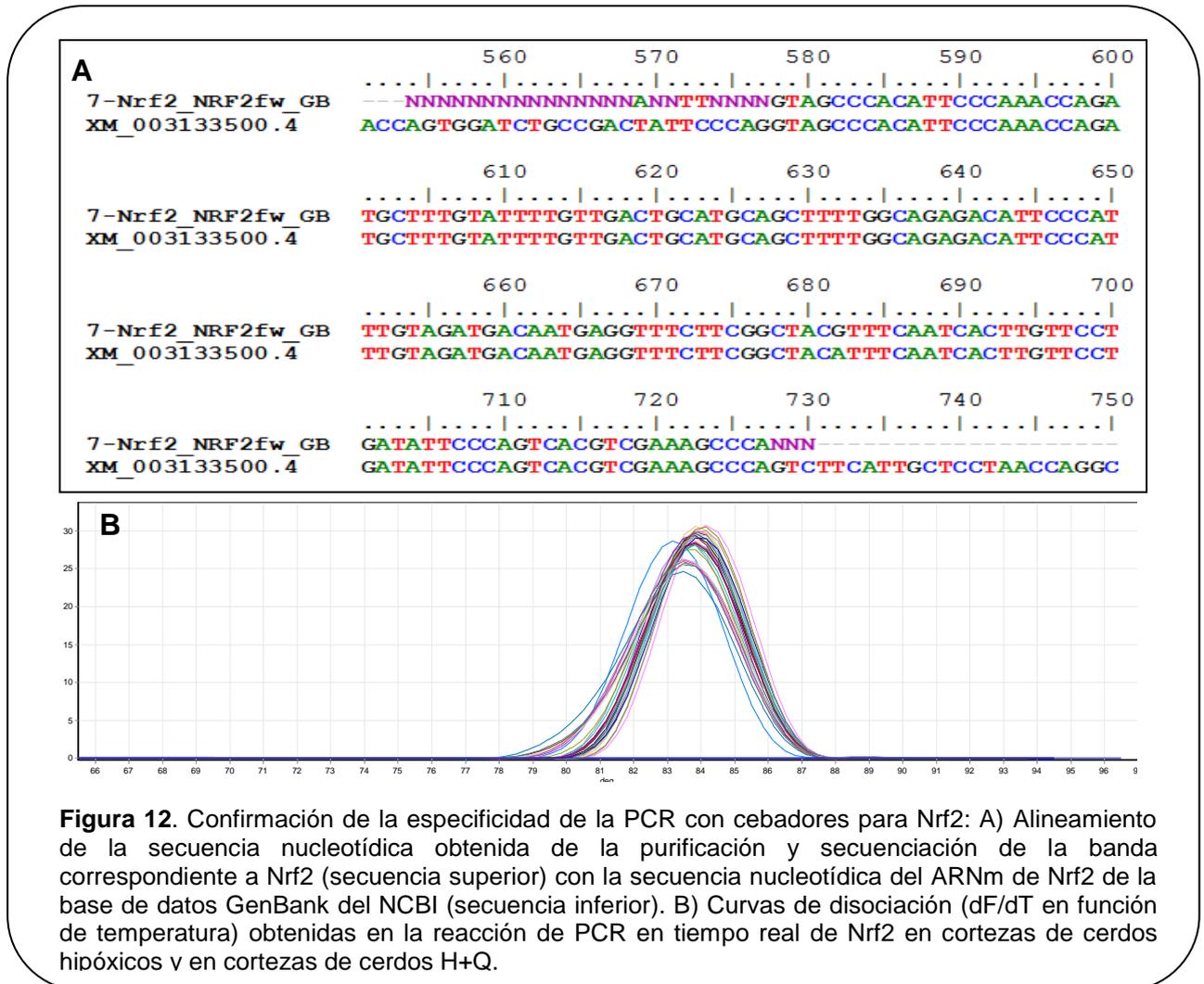
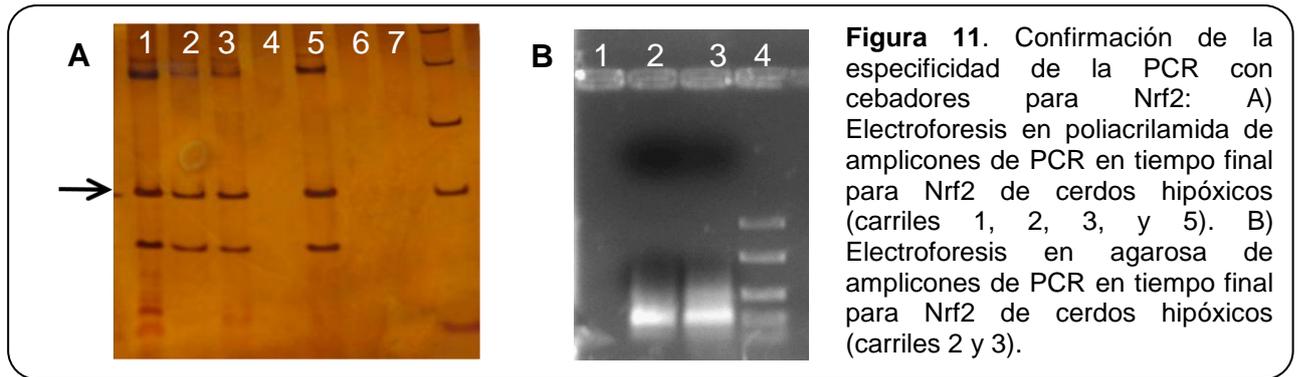


Figura 12. Confirmación de la especificidad de la PCR con cebadores para Nrf2: A) Alineamiento de la secuencia nucleotídica obtenida de la purificación y secuenciación de la banda correspondiente a Nrf2 (secuencia superior) con la secuencia nucleotídica del ARNm de Nrf2 de la base de datos GenBank del NCBI (secuencia inferior). B) Curvas de disociación (dF/dT en función de temperatura) obtenidas en la reacción de PCR en tiempo real de Nrf2 en cortezas de cerdos hipóxicos y en cortezas de cerdos H+Q.

Análisis de los niveles de ARNm mediante PCR en tiempo real

Luego se procedió a evaluar la eficiencia en PCR en tiempo real para cada uno de los genes a estudiar obteniéndose muy buenas eficiencias en todos los casos. La eficiencia de Nrf2 y HIF-1 α para los tejidos de corteza, hipocampo y estriado son 103% y 94% respectivamente, mientras que las eficiencias para HO-1 y Actina en corteza e hipocampo son 97% y 94% respectivamente, y en estriado 99% y 97%. En la tabla 8 se resumen las eficiencias obtenidas para cada gen. En la figura 13 se muestran las curvas estándar realizadas para el cálculo de las eficiencias.

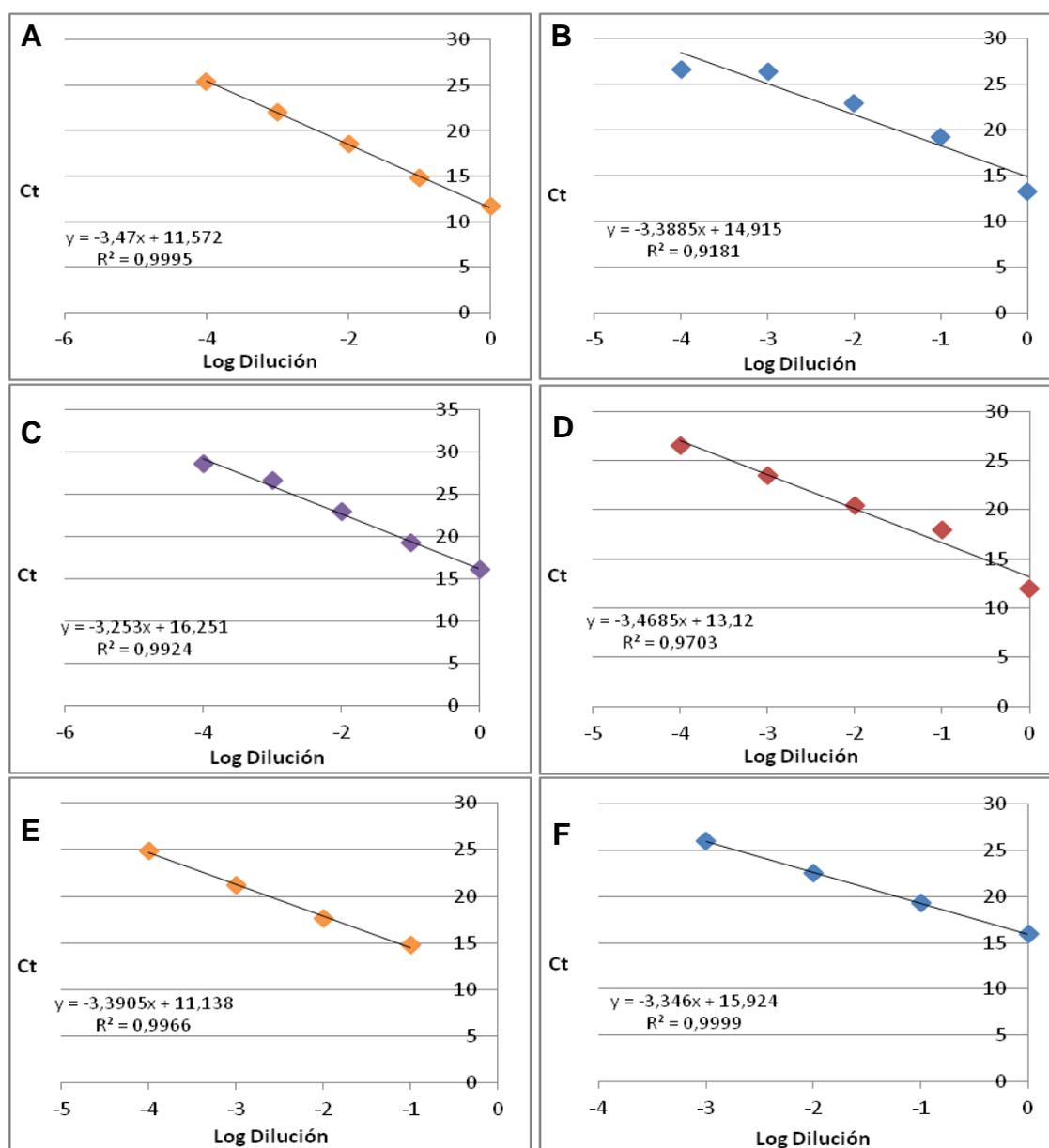


Figura 13. Curvas estándar para el cálculo de las eficiencias de reacción en PCR en tiempo real. A) Actina en corteza e hipocampo. B) HO-1 en corteza e hipocampo. C) Nrf2 en corteza, hipocampo y estriado. D) HIF-1 α en corteza, hipocampo y estriado. E) Actina en estriado. F) HO-1 en estriado.

Tabla 8. Eficiencias Calculadas

Gen	Eficiencia	Tejido
Nrf2	103%	Corteza e hipocampo
HIF-1 α	94%	Corteza e hipocampo
Actina	94%	Corteza e hipocampo
Actina	97%	Estriado
HO-1 (juego de cebadores #1)	97%	Corteza e hipocampo
HO-1 (juego de cebadores #2)	99%	Estriado

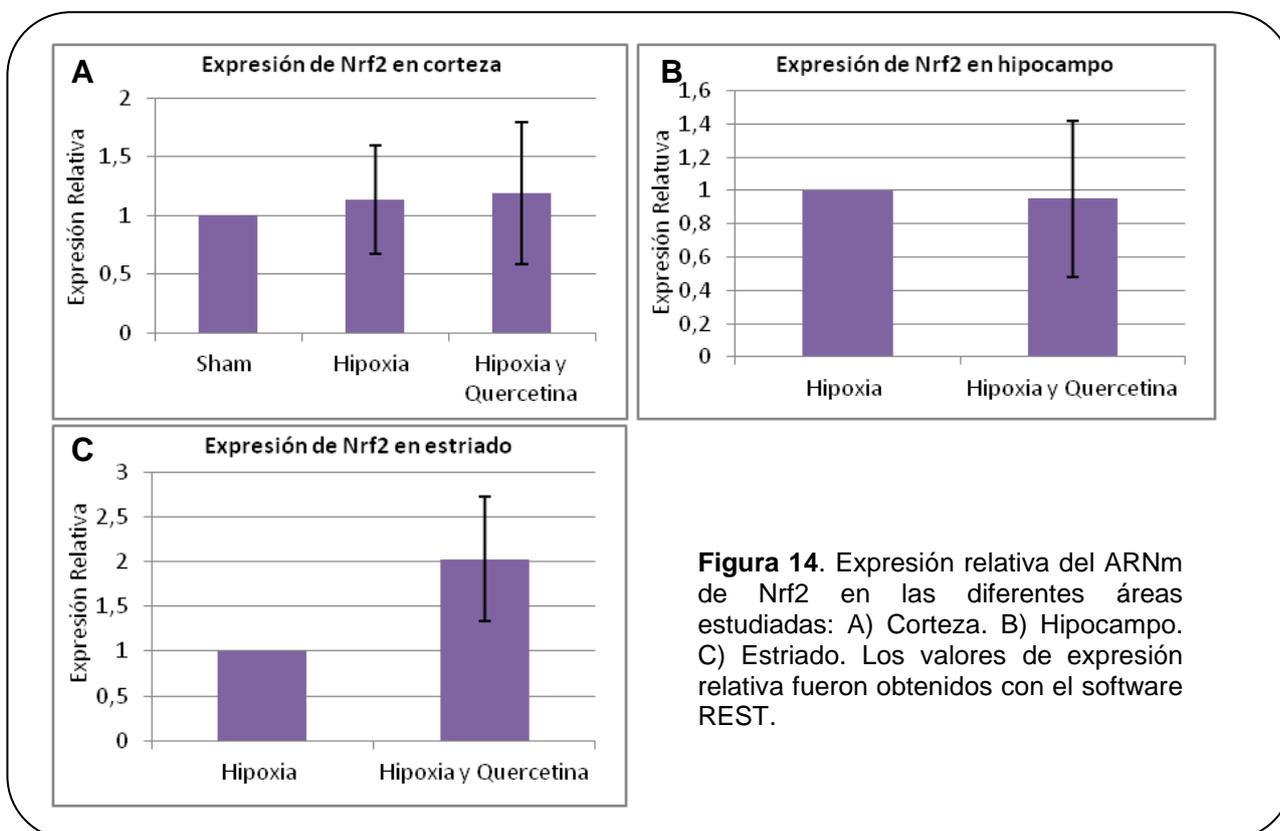
Se procedió al análisis por PCR en tiempo real de las muestras de corteza, hipocampo, y estriado de los cerdos con 8 horas de sobrevida. Los ensayos de RT-PCR confirmaron la alta variabilidad de nuestro material biológico lo que hizo necesario aumentar el tamaño de la muestra, y aún así fue dificultoso obtener valores homogéneos y por tanto con significancia estadística. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la expresión relativa de los diferentes ARNm estudiados calculadas con el software REST a partir de la ecuación de PffafI citada en materiales y métodos. En corteza, la expresión relativa se calculó para los cerdos hipoxia y los cerdos H+Q con respecto a los cerdos control, en donde la expresión relativa de cada gen se considera 1, mientras que en hipocampo y estriado la expresión relativa de los cerdos H+Q se calculó con respecto a los cerdos hipoxia (en donde la expresión relativa de cada gen se considera 1). En dicha tabla se puede observar que únicamente la expresión relativa de HO-1 en corteza de los cerdos hipóxicos tiene una diferencia significativa (valor p menor a 0,05). De todas formas, fue posible distinguir ciertas tendencias acerca del comportamiento de los genes estudiados en las diferentes condiciones experimentales que se presentan a continuación.

Tabla 9. Expresión relativa de los genes estudiados y su significancia estadística

Tejido	Condición	ARNm	Expresión relativa	Valor p
Corteza	Sham vs Hipoxia	HO-1	3,283	0,025
		Nrf2	1,139	0,901
		HIF-1 α	0,405	0,247
	Sham vs Hipoxia + Quercetina	HO-1	0,534	0,6665
		Nrf2	1,192	0,9675
		HIF-1 α	1,167	0,9895
Hipocampo	Hipoxia vs Hipoxia + Quercetina	HO-1	0,518	0,427
		Nrf2	0,949	0,8805
		HIF-1 α	1,126	0,794
Estriado	Hipoxia vs Hipoxia + Quercetina	HO-1	0,797	0,553
		Nrf2	2,024	0,162
		HIF-1 α	1,308	0,7695

En el caso del ARNm de Nrf2, el nivel de expresión del mismo no muestra variación en los distintos grupos experimentales en hipocampo y en corteza. Si bien, los resultados obtenidos no resultaron ser significativos estadísticamente, en estriado vemos que se

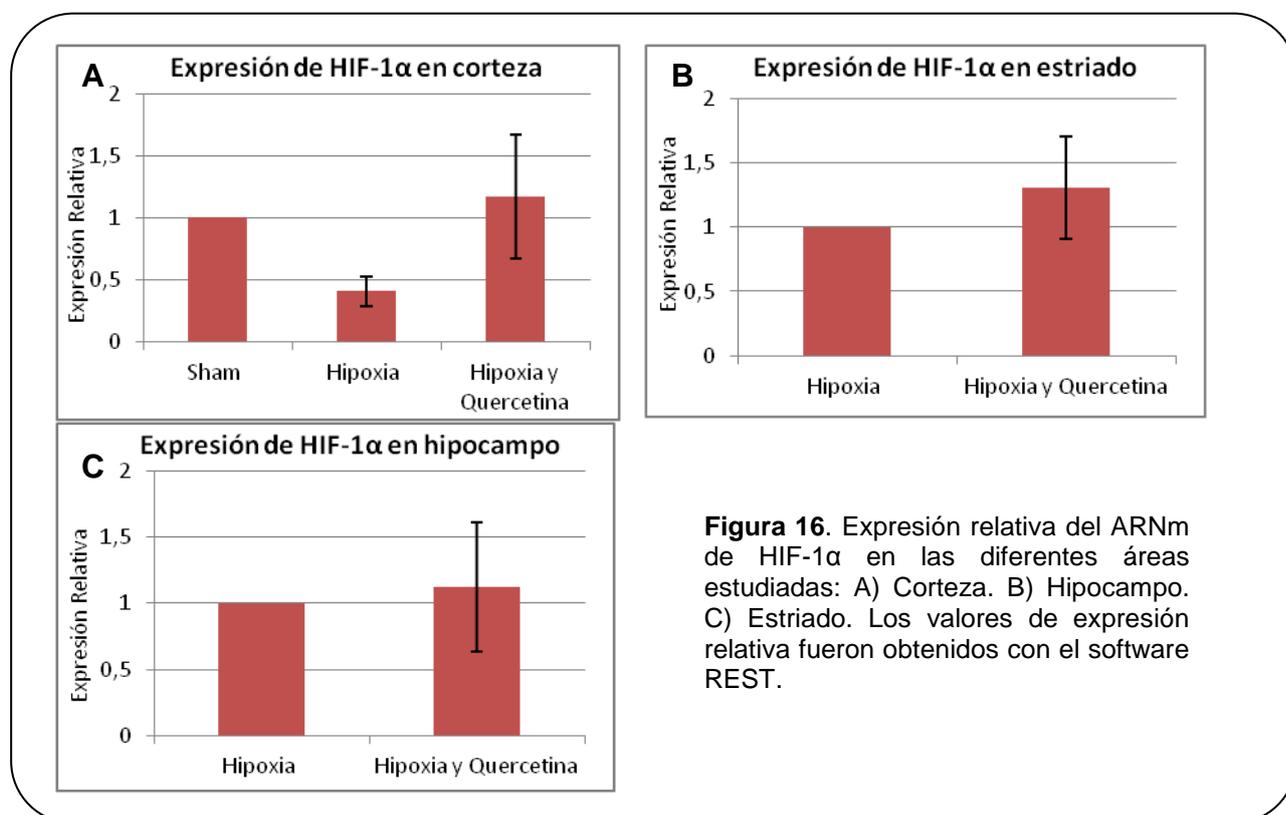
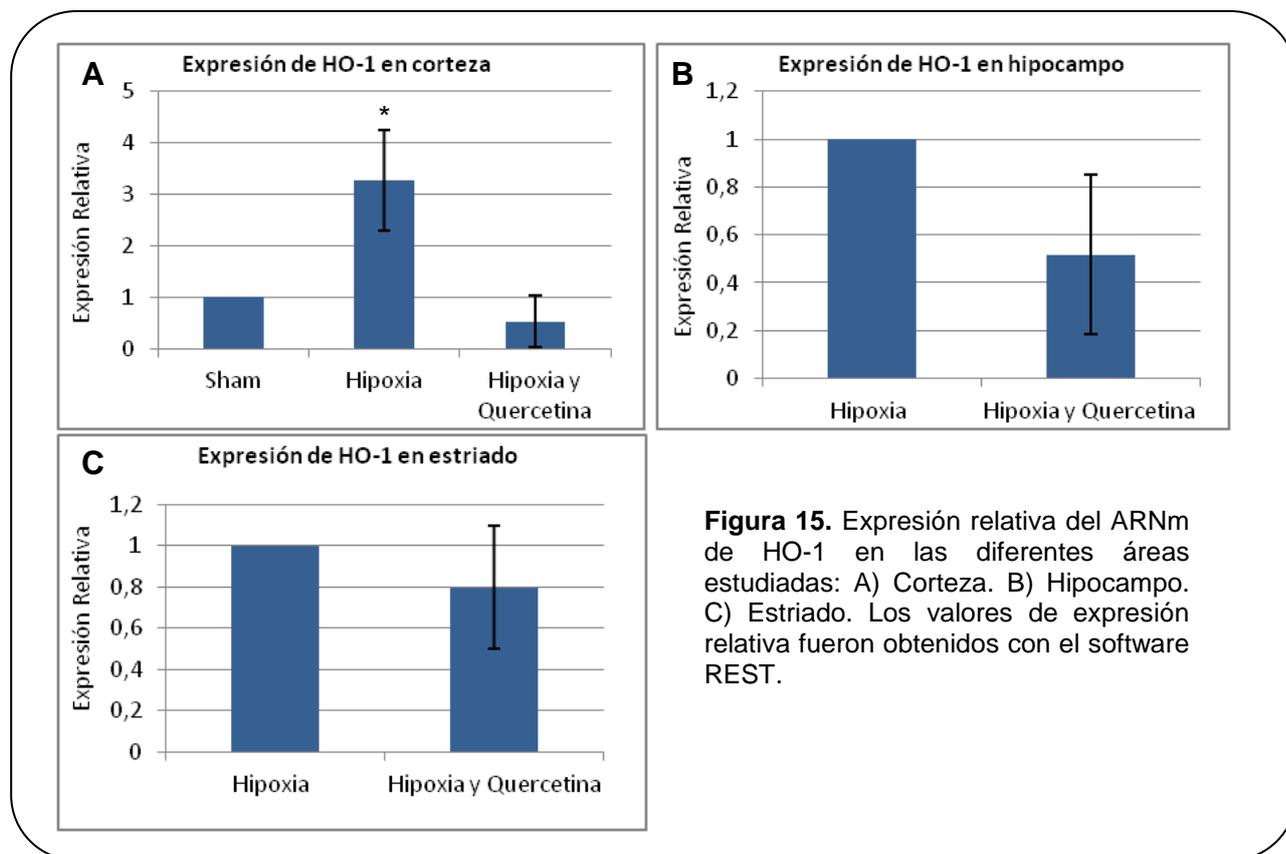
duplica la expresión del ARNm en los cerdos sometidos a hipoxia y tratados con quercetina con respecto a los cerdos hipóxicos sin tratar. En la figura 14 se presentan dichos resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real y analizados mediante el software REST (figura 14).



En cuanto a los niveles del ARNm de HO-1, en la corteza éstos aumentarían 3 veces en la hipoxia respecto al sham, mientras que en aquellos animales que recibieron quercetina tras la hipoxia, los niveles de HO-1 parecen disminuir con respecto a los animales sometidos a hipoxia y también con respecto a los animales control. En hipocampo también observamos que los animales tratados con quercetina muestran niveles más bajos que los sometidos a hipoxia sin este tratamiento. En estriado, los niveles del ARNm de HO-1 también disminuyen en los animales sometidos a hipoxia y tratados con quercetina cuando los comparamos con los niveles de mensajero en los animales sometidos a hipoxia, pero que no recibieron el preparado de quercetina. Sin embargo, esta disminución no es tan marcada como en corteza e hipocampo (figura 15).

En cuanto a HIF-1 α , en corteza, los niveles del mensajero de HIF-1 α parecen disminuir a más de la mitad en los animales sometidos a hipoxia en comparación con los animales control y aumentan en aquellos animales sometidos a hipoxia y tratados con quercetina, es decir que los niveles aumentarían hasta llegar a niveles basales en este grupo experimental. De forma similar, en hipocampo y estriado se observa que los niveles del mensajero de HIF-1 α aumentan muy levemente en los cerdos sometidos a hipoxia y

tratados con el preparado respecto a los animales sometidos a hipoxia sin tratamiento (figura 16).



En estriado los resultados de PCR en tiempo real parecerían estar marcando un patrón diferente con respecto a hipocampo y corteza. Se observa una menor disminución de la expresión relativa de HO-1 en los cerdos tratados con quercetina, y un aumento del ARNm de Nrf2.

Análisis de niveles proteicos mediante Western Blot

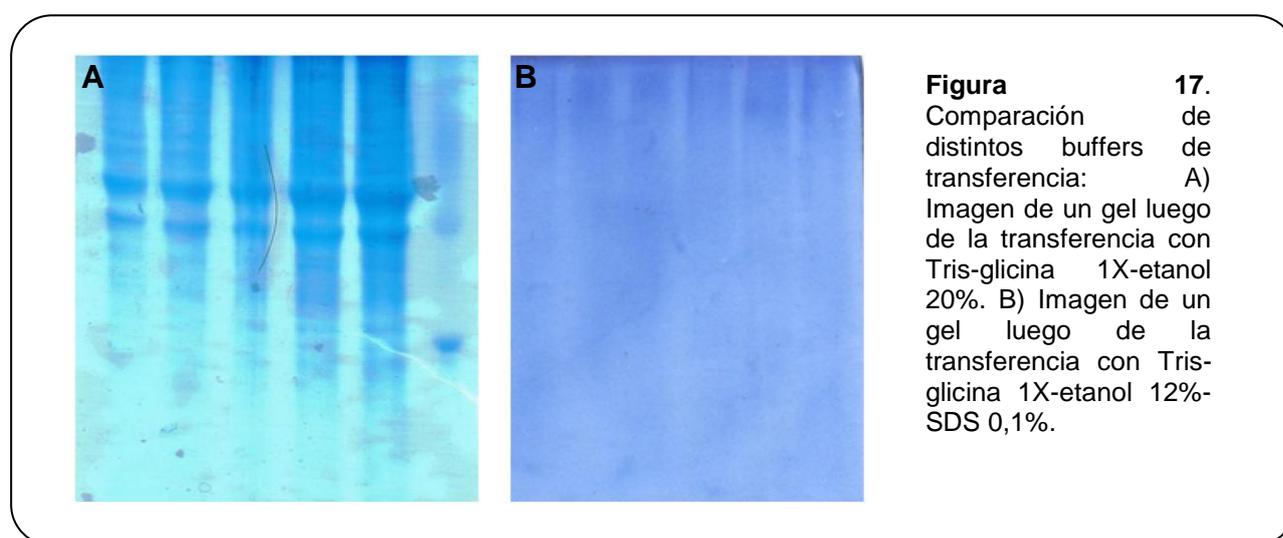
En lo referente al ensayo de western blot, la puesta a punto para estas tres proteínas resultó dificultosa, y requirió de numerosas pruebas en las que se fueron cambiando y ajustando las diferentes condiciones del ensayo. Cabe resaltar que en el caso de Nrf2 se probaron 3 anticuerpos comerciales diferentes, y en el caso de HO-1 2 anticuerpos comerciales diferentes, que se muestran en la tabla 10. Otros parámetros que se modificaron fueron:

- Concentración del gel: Se probaron las concentraciones del gel separador 10%, 12% y 15%, y en el caso del gel concentrador se probaron las concentraciones 5% y 3.75%.
- Buffer de transferencia: Los tres buffers de transferencia utilizados fueron Tris-glicina 1X-etanol 20%, Tris-glicina 1X-etanol 12%-SDS 0,1%, Tris-glicina 1X-etanol 12%-SDS 0,025%.
- Condiciones de transferencia: 17 horas a 40mA y 100V, 3 horas a 300mA y 90V, y 1 hora 45 minutos a 300 mA y 100V.
- Concentración de Anticuerpo: Se probaron las diluciones que se muestran en la tabla 10.
- Tiempo de incubación con el anticuerpo primario: 1 hora, 2 horas, y overnight.
- Concentración de Anticuerpos Secundarios: Diluciones 1/2000, 1/5000, 1/7000 y 1/10000.
- Solución de bloqueo: Se probaron tres soluciones de bloqueo PBS-leche descremada 5%, TBS- leche descremada 5%, y TBS-BSA 3%
- Solución de lavado: TBS-Tween 0,05%, y PBS- Tween 0.05%.
- Solución de revelado: Se probaron 2 métodos diferentes, uno de ellos con un substrato quimioluminiscente preparado de forma casera, y un substrato comercial citado en materiales y métodos.
- Obtención de imágenes: tanto mediante G-Box, como por técnicas tradicionales de revelado fotográfico.
- Cantidad de proteína cargada: de 30 a 50 ug

Tabla 10. Anticuerpos y diluciones probadas

Proteína	Anticuerpo	Diluciones
Nrf2	α -Nrf2 sc-722 Santa Cruz Biotechnology	1/100, 1/200
	α -Nrf2 ab53019 Abcam	1/100 1/500
	α -Nrf2 ab894443 Abcam	1/1000
HO-1	α - HO-1 OSA-110 Stressgen Biotechnologies	1/100, 1/400
	α -HO-1 ADI-SPA-895 Enzo Life Sciences	1/500, 1/1000, 1/5000
HIF-1 α	α -HIF-1 α Ab4 Thermo Scientific	1/100, 1/200

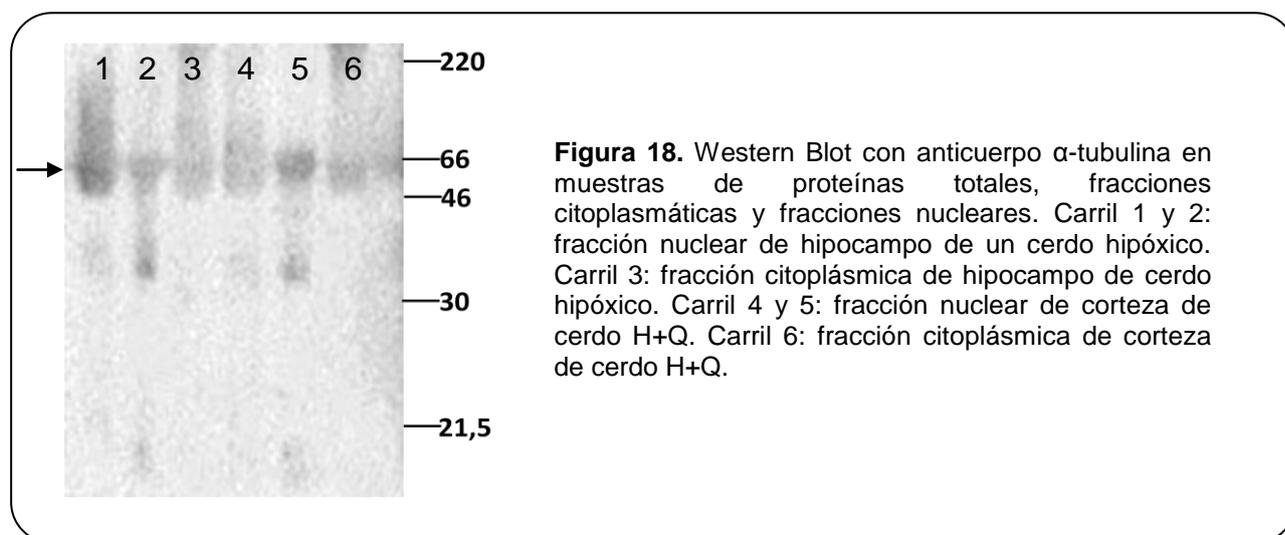
Algunas de las condiciones modificadas resultaron ser de gran importancia, como el uso de SDS y la disminución de la cantidad de etanol en el buffer de transferencia, lo cual mejoró la transferencia de las proteínas de mayor peso molecular. A modo ilustrativo de esta situación, se presentan en la figura 17 la imagen de 2 geles escaneados luego de la transferencia, uno de los cuales fue transferido utilizando Tris-glicina 1X-etanol 20%, y el otro gel utilizando Tris-glicina 1X-etanol 12%-SDS 0,1%, y se evidencia una gran cantidad de proteínas remanentes tras la transferencia en el gel transferido sin SDS y con mayor porcentaje de etanol y la ausencia total de proteínas en el transferido con SDS y menor cantidad de etanol, donde la gran mayoría habría pasado a la membrana.



Otro cambio crítico fue el uso de una solución de revelado comercial mucho más sensible que la solución que se venía usando hasta ese momento. Las condiciones que fueron finalmente utilizadas son las que se describen en materiales y métodos.

Además de estas variaciones de la técnica ya mencionadas, se probó realizar un fraccionamiento proteico de las muestras de corteza con el fin de obtener fracciones nucleares y fracciones citoplásmicas de las muestras. Esto cumpliría dos objetivos: por un lado obtener las proteínas más concentradas en la fracción que le corresponde, y por

otro cuantificar la translocación nuclear descrita en la bibliografía para Nrf2 y HIF-1 α . Sin embargo, a pesar de realizar dos protocolos de fraccionamiento diferentes no se logró obtener una buena separación de proteínas nucleares y citoplásmicas, ya que en todos los casos la concentración de las fracciones nucleares era ínfima, y al realizar un western blot con incubación de tubulina se podía evidenciar la presencia de dicha proteína en ambas fracciones (figura 18).

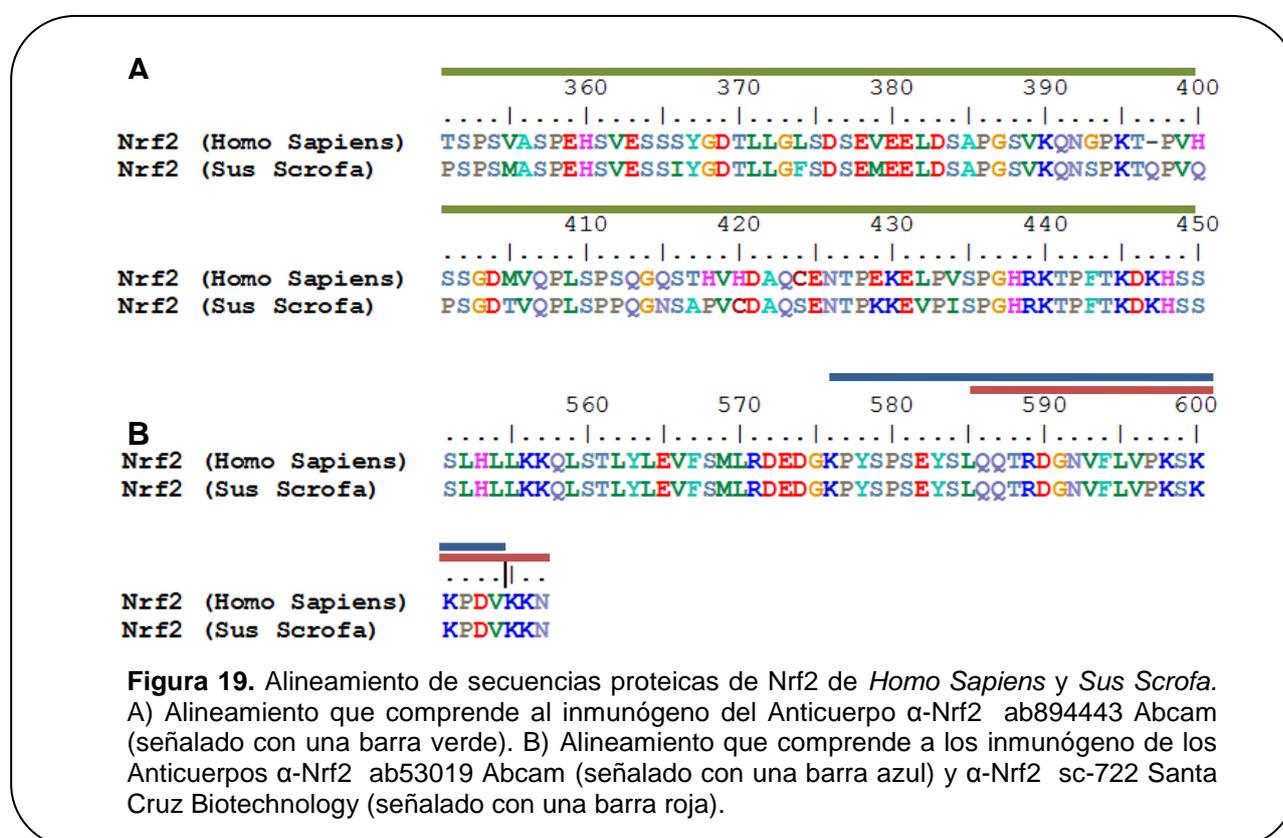


Dado que no existen anticuerpos específicos para las proteínas de cerdo estudiadas en este trabajo, debimos trabajar con anticuerpos dirigidos contra las proteínas homólogas de otras especies. En la tabla 11 se muestra para cada uno de los anticuerpos probados el inmunógeno contra el cual fueron generados y las especies en las cuales son reactivos.

Tabla 11. Inmunógenos y detección de los anticuerpos utilizados

Proteína	Anticuerpo	Inmunógeno	Detección
Nrf2	α -Nrf2 sc-722 Santa Cruz Biotechnology	20 residuos en C terminal de Nrf2 de humano	Recomendado para la detección de Nrf2 de ratón, rata, y humano. También es reactivo con especies adicionales incluidas especies caninas, bovinas y porcinas.
	α -Nrf2 ab53019 Abcam	Aminoácidos 576-605 de Nrf2 de humano	Detecta Nrf2 de rata, humano y cerdo. Se predice que funciona con raton
	α -Nrf2 ab894443 Abcam	Aminoácidos 351-450 de Nrf2 de humano	Detecta Nrf2 de rata y humano. Se predice que puede detectar Nrf2 de chimpanse, mono, gorila y orangutan
HO-1	α - HO-1 OSA-110 Stressgen Biotechnologies	HO-1 nativa de rata purificada (Hsp32)	Detecta HO-1 de humano, ratón, rata, caninos, cobaya, hamster, y mono
	α -HO-1 ADI-SPA-895 Enzo Life Sciences	HO-1 de rata (Hsp32) recombinante, sin la región transmembrana	Detecta Nrf2 de humano, ratón, rata, perro, conejo, y oveja
HIF-1 α	α -HIF-1 α Ab4 Thermo Scientific	Aminoácidos 432-528 de humano	Detecta HIF-1 α de humano, oveja, ratón, rata, y hurón

Para verificar que los epitopes que reconocen estos anticuerpos existen en las proteínas homólogas de cerdo, se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas obtenidas de la base de datos del NCBI de cada una de las proteínas de las especies en cuestión (cerdo, rata, humano, etc.), encontrando en todos los casos que en esas regiones las proteínas compartían un alto grado de homología. No obstante, no ignoramos el hecho de que existen cuestiones conformacionales que afectan la capacidad de un anticuerpo de reconocer su antígeno. En la figura 19 se muestra la región pertinente del alineamiento de la secuencia proteica de Nrf2 de humano y de cerdo, que abarca los epitopes de Nrf2 contra los cuales fueron diseñados los anticuerpos comerciales utilizados en este trabajo, donde se puede constatar una alta homología entre estas dos secuencias proteicas en esas regiones.



En el caso de los anticuerpos α -HIF-1 α y HO-1 α , los mismos fueron generados contra las proteínas de rata y humano respectivamente. En el caso del anticuerpo HO-1, el inmunógeno utilizado para la generación de este anticuerpo fue la proteína de rata en su totalidad, y al comparar la secuencia peptídica de HO-1 de rata, con la correspondiente de cerdo, encontramos que existen numerosas variaciones puntuales entre ambas secuencias. Sin embargo, gran parte de estas variaciones son compartidas con la secuencia peptídica de HO-1 de humano y/o ratón, las cuales, según los fabricantes son detectables por estos anticuerpos (figura 20). En la figura 21 se presenta la región

pertinente del alineamiento de la secuencia proteica de HIF-1 α de humano y de cerdo, que abarca los epitopes de dicha proteína contra los cuales fueron diseñados los anticuerpos comerciales, donde se puede constatar una alta homología entre estas dos secuencias proteicas en esa región.

```

          10      20      30      40      50      60
HO-1 (Rattus Norvegicus)  MERPQLDSMSQDLSEALKEATKEVHIRAENSEEFMRNFQKGQVSRREGFKLVMASLYHIYTA
HO-1 (Sus Scrofa)        MEHSQPNSMPQDLSEALKEATKEVHVQAENAEFMRNFQKGEVTRREGFKLVMASLYHIYDA
HO-1 (Homo Sapiens)      MERPQPDSPQDLSEALKEATKEVHTQAENAEFMRNFQKGQVTRDGFVKLVMASLYHIYVA
HO-1 (Mus Musculus)     MERPQPDSPQDLSEALKEATKEVHIQAENAEFMRNFQKGQVSRREGFKLVMASLYHIYTA

          70      80      90      100     110     120
HO-1 (Rattus Norvegicus)  LEEEIERNKQNPVYAPLYFPEELHRRRAALEQDMAFWYGPHWQEAIPYTPATQHYVVKRLHE
HO-1 (Sus Scrofa)        LEEEIERNKQNPVYAPLYFPEELHRRRAALEQDMAFWYGPRWQEAIPYTPATQHYVVKRLHE
HO-1 (Homo Sapiens)      LEEEIERNKQNPVYAPLYFPEELHRRRAALEQDMAFWYGPRWQEAIPYTPATQHYVVKRLHE
HO-1 (Mus Musculus)     LEEEIERNKQNPVYAPLYFPEELHRRRAALEQDMAFWYGPHWQEAIPYTPATQHYVVKRLHE

          130     140     150     160     170     180
HO-1 (Rattus Norvegicus)  VGGTHPELLVAHAYTRYLGDLSGGQVLKKAQKAMALPSSGEGLAFFTFPNSIDNPTKFKQ
HO-1 (Sus Scrofa)        VGRTEPELLVAHAYTRYLGDLSGGQVLKKAQKALDLPSSGEGLAFFTFPNVANATKFKQ
HO-1 (Homo Sapiens)      VGRTEPELLVAHAYTRYLGDLSGGQVLKKAQKALDLPSSGEGLAFFTFPNIASATKFKQ
HO-1 (Mus Musculus)     VGRTHPELLVAHAYTRYLGDLSGGQVLKKAQKAMALPSSGEGLAFFTFPNSIDNPTKFKQ

          190     200     210     220     230     240
HO-1 (Rattus Norvegicus)  LYRARMNTLEMTPEVKHRVTEEAKTAFLLNIQLFEEELQALLTEEHKQDQSPSQTEFLRQRP
HO-1 (Sus Scrofa)        LYRARMNTLEMTPEVKHRVTEEAKTAFLLNIQLFEEELQALLTEEHKQDQSPSQTEFLRQRP
HO-1 (Homo Sapiens)      LYRARMNTLEMTPEVKHRVTEEAKTAFLLNIQLFEEELQALLTEEHKQDQSPSQTEFLRQRP
HO-1 (Mus Musculus)     LYRARMNTLEMTPEVKHRVTEEAKTAFLLNIQLFEEELQALLTEEHKQDQSPSQTEFLRQRP

          250     260     270     280
HO-1 (Rattus Norvegicus)  ASLVQDSTSAETPRGKQISTSSSQTPLLRWLTLSPVAVGIYAM
HO-1 (Sus Scrofa)        GSRVQDSTPVTTPRGKQISTSSSQTPLLRWLTLSPVAVGIYAM
HO-1 (Homo Sapiens)      SNKVQDSTPVTTPRGKQISTSSSQTPLLRWLTLSPVAVGIYAM
HO-1 (Mus Musculus)     ASLVQDSTPVTTPRGKQISTSSSQTPLLRWLTLSPVAVGIYAM

```

Figura 20. Alineamiento de secuencias proteicas de HO-1 de *Rattus Norvegicus*, *Sus Scrofa*, *Homo Sapiens* y *Mus Musculus*.

```

          410     420     430     440     450
HIF-1alpha (Homo Sapiens)  APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLLEEVPLYNDVMLPSPNEKLNINLAM
HIF-1alpha (Sus Scrofa)   APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLLEEVPLYNDVMLPSSNEKLNINLAM

          460     470     480     490     500
HIF-1alpha (Homo Sapiens)  SPLPASETTPKPLRSTADPALNQEVALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQTP
HIF-1alpha (Sus Scrofa)   SPLPASETTPKPLRSTADPALNQEVALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQPA

          510     520     530     540     550
HIF-1alpha (Homo Sapiens)  SPSPDGSSTRQSSPEPNPSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLFPAEDTEAKNP
HIF-1alpha (Sus Scrofa)   SPSPDGSSTRQSSPEPNPSEYCFDVS DMVNEFKLELVEKLFPAEDTEAKNP

```

Figura 21. Alineamiento de secuencias proteicas de HIF-1 α de *Sus Scrofa* y *Homo Sapiens*. En violeta se señala el inmunógeno contra el cual se generó el anticuerpo α -HIF-1 α Ab4 Thermo Scientific

Más allá del arduo trabajo realizado en la puesta a punto nos encontramos con bandas de pesos moleculares muy diferentes a lo esperado. Por ejemplo, en el caso de Nrf2

obtuvimos reiteradas veces bandas de 50KDa y 30KDa, cuando el peso molecular esperado para esta proteína es de 68KDa. También se han reportado en la bibliografía para esta proteína otros pesos moleculares como por ejemplo 98KDa, 100KDa, y 120KDa. Los autores adjudican esta diferencia en el peso molecular a modificaciones postraduccionales como son la ubiquitinación y la fosforilación. En el caso de HIF-1 α el peso molecular esperado es de 110KDa, pero en reiteradas ocasiones obteníamos una banda inespecífica entre 60 y 70 KDa.

Dado que son proteínas de muy baja expresión, y que no existen anticuerpos específicos para cerdo, la puesta a punto necesitó de un control positivo, para lo cual se usaron extractos proteicos de gránulos de cerebelo de rata (proporcionados por Florencia Arredondo), en las cuales se había comprobado la inducción por quercetina tanto de Nrf2 como HO-1. En las figuras 22 y 23 se muestran los resultados obtenidos en proteínas de cerdo y en proteínas de rata en simultáneo para Nrf2 y HO-1 respectivamente. En estas figuras, a pesar de la presencia de bandas inespecíficas, se logra visualizar la banda del tamaño esperado para cada una de las proteínas.

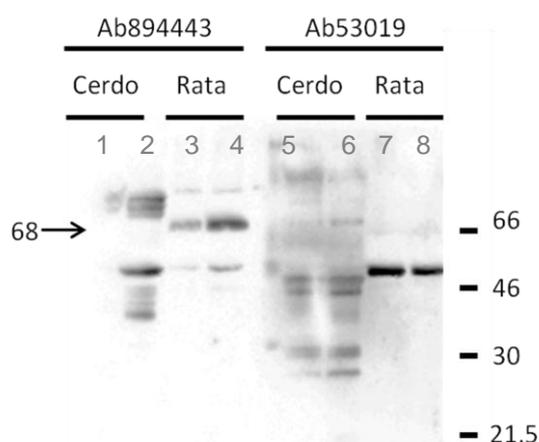


Figura 22. Obtención e identificación de la banda correspondiente a Nrf2 mediante comparación con control positivo. Carril 1 y 5: muestra corteza de cerdo hipóxico. Carril 2 y 6: muestra de corteza de cerdo H+Q. Carril 3 y 7: muestras control de gránulos cerebelosos de rata. Carril 4 y 8: muestras de gránulos cerebelosos de rata tratados con quercetina. Del carril 1 al 4 fueron incubados con anticuerpo α -Nrf2 ab894443 Abcam. Del carril 5 al 8 fueron incubados con anticuerpo α -Nrf2 ab53019 Abcam. La flecha indica la banda correspondiente a Nrf2.

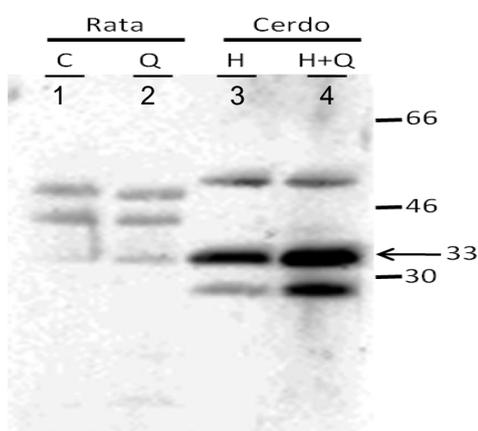
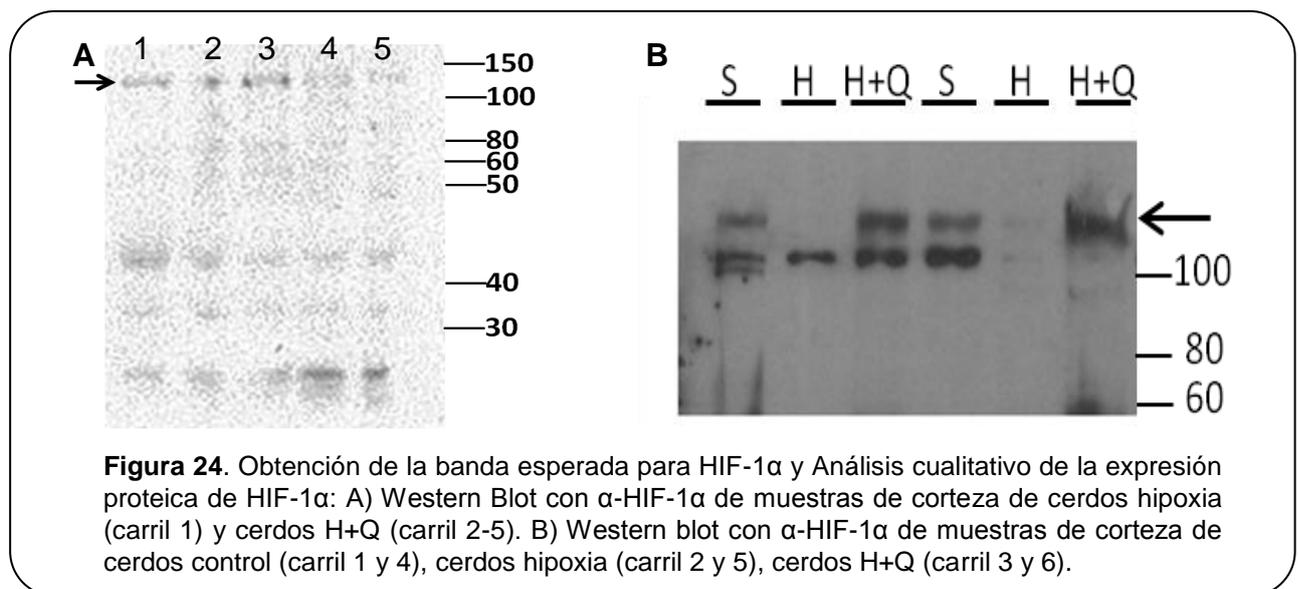


Figura 23. Obtención e identificación de la banda correspondiente a HO-1 mediante comparación con control positivo. Carril 1: muestra corteza de cerdo hipóxico. Carril 2: muestra de corteza de cerdo H+Q. Carril 3: muestras control de gránulos cerebelosos de rata. Carril 4: muestras de gránulos cerebelosos de rata tratados con quercetina. La membrana fue incubada con anticuerpo α -HO-1 ADI-SPA-895 Enzo Life Sciences. La flecha indica la banda correspondiente a HO-1.

Las características del propio tejido y de las proteínas que estudiamos, que presentan una baja expresión, aún cuando son inducidas, dificultó la reproducibilidad en la visualización de las bandas. Estas condiciones imposibilitaron la obtención de datos para la determinación del nivel de expresión de las proteínas.

En el caso de HIF-1 α también se logró la visualización de la banda esperada, y se muestra en la figura 24. De igual forma, se constató una baja reproducibilidad en la obtención de estas bandas, ya que a pesar de innumerables repeticiones y variaciones fue dificultosa la obtención de un número aceptable de ensayos de western blots exitosos y repetibles que permitiese la cuantificación. De todas formas, un análisis cualitativo del nivel de expresión proteica fue posible en el caso de HIF-1 α . La técnica de western blot para HIF-1 α permite visualizar la banda correspondiente a esta proteína, y estaría evidenciando una mayor expresión de la proteína en los cerdos control y en los cerdos sometidos a hipoxia tratados con quercetina, mientras que en el grupo experimental de cerdos sometidos a hipoxia, al cabo de 8 horas la expresión de HIF-1 α estaría disminuida.



Análisis del perfil proteómico por Electroforesis 2D

Frente a las dificultades con los ensayos de Western Blot, y considerando la posibilidad de ir a la búsqueda de proteínas importantes en esta respuesta y en este modelo en particular, se decidió estudiar las diferencias en la expresión proteica en los tres grupos experimentales de corteza cerebral con un enfoque más global mediante abordaje proteómico. Para ello, se realizó la extracción y tratamiento de proteínas, que se utilizaron para realizar geles bidimensionales (dos réplicas biológicas de cada condición,

cada una con su duplicado técnico). En esta tesina se presentan los resultados preliminares obtenidos con esta técnica con un N=2. Se encontraron 34 "spots" que presentaron diferencias en las distintas condiciones experimentales. De éstos, se seleccionaron los 24 que presentaron una mayor variación para su identificación mediante espectrometría de masas. Se logró la identificación de 17 proteínas. En la figura 25 se muestra uno de los geles obtenidos donde se señalan las proteínas identificadas, y en la tabla 12 se muestran las proteínas identificadas.

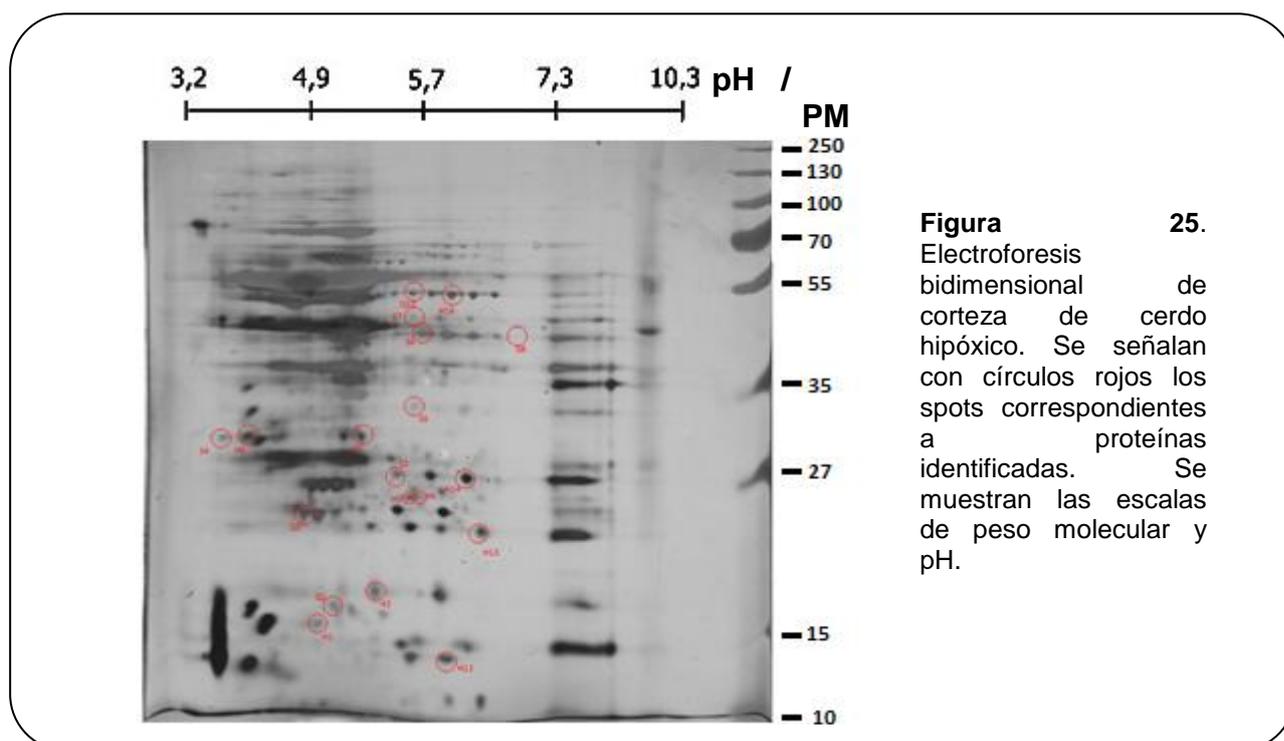
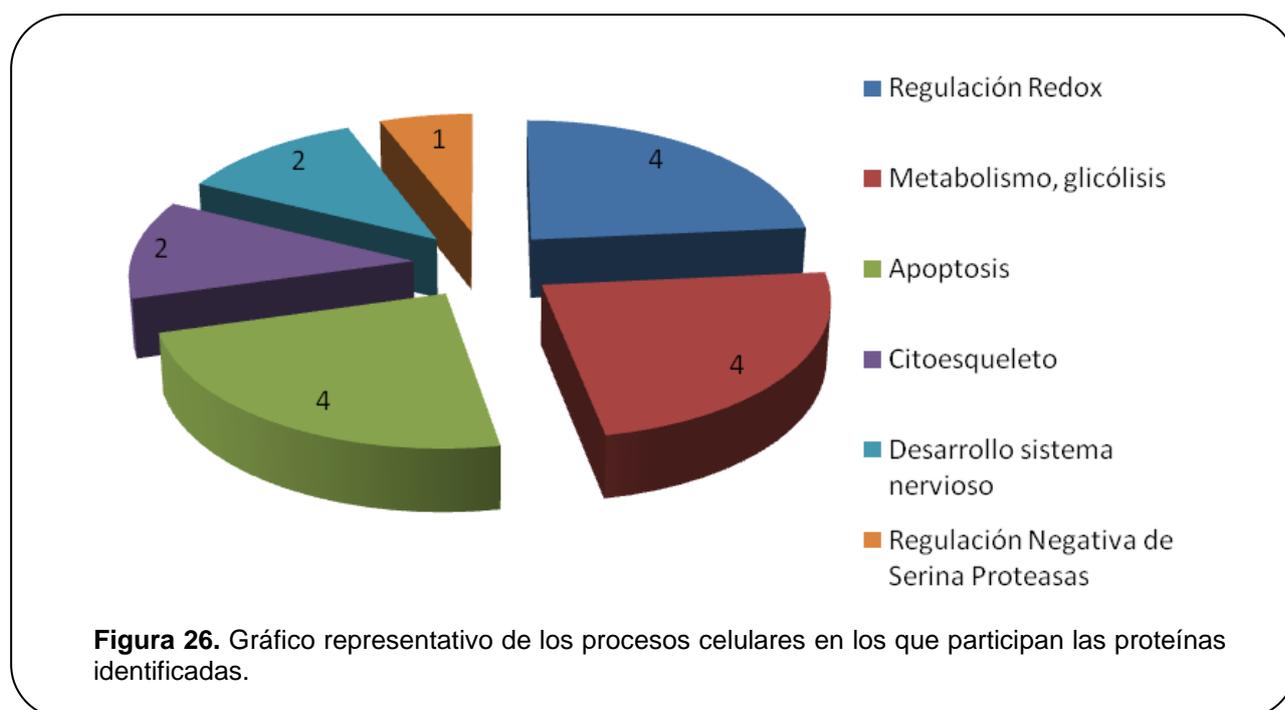


Tabla 12. Proteínas identificadas

Proteínas Identificadas	PM teórico	PI aproximado
Triosephosphate isomerase 1	26.6	5.5 a 7,0
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A isoform X3	32.3	4
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1.	30.7	6
Aldolase C, fructose-bisphosphate	39.3	6
Glia maturation factor beta	16	5
Cofilin-1	18.5	5.4
NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 2	25	6
Glutathione S-transferase P	23,4	6
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	28,4	6
Prohibitin	29.8	5.2
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	28	4
Superoxide dismutase 1	15.2	6
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	20	6
Alpha-enolase	61	5,5 a 5.9
Stathmin	17	5.1
Fructose-bisphosphate aldolase A	39	6.8
Beta-Actin	44.7	5.7

Algunas de estas proteínas tienen una identidad y función bastante conocidas (Actina, Aldolasa, etc), mientras que otras son más específicas (Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A isoform X3, Phosphatidylethanolamine-binding protein 1) por lo que fuimos a buscar en la bibliografía que funciones cumplían estas proteínas y con qué vías celulares estaban vinculadas. Muchas de estas proteínas cumplen más de una función o participan o afectan más de una vía celular, pero nos centramos en aquellas funciones que podrían estar más vinculadas a la respuesta a la hipoxia y/o a la quercetina. Nos encontramos con que los tres procesos celulares mayormente representados en este conjunto de proteínas son el metabolismo, en particular la glucólisis, la apoptosis y la regulación del estado redox celular, tres funciones con gran importancia en la respuesta a la hipoxia. Además encontramos otras funciones como desarrollo del Sistema nervioso, control del ciclo celular y citoesqueleto. En la figura 26 se muestran las proteínas identificadas agrupadas según el proceso celular en el que participan.



Para la obtención de una cuantificación preliminar de la expresión de las proteínas identificadas, se analizó la intensidad relativa de cada spot en los diferentes geles, normalizadas por la intensidad de un área constante y se expresan en unidades arbitrarias. En la figuras 27, 28, 29 y 30 se muestran los cambios observados en cada una de las proteínas para cada una de las situaciones experimentales. Encontramos que en algunos casos proteínas con funciones relacionadas presentaban cambios similares. Por ejemplo, vemos un aumento en todas las proteínas vinculadas con la regulación redox en los cerdos hipóxicos respecto a los cerdos control, y tres de ellas aumentan

aún más con el tratamiento con quercetina.

A

Función	Proteína	S vs H	H vs Q
Regulación Redox	NADH dehidrogenase ubiquinone flavoprotein 2	Aumenta	Aumenta
	Glutathione S-transferase P	Aumenta	Aumenta
	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Aumenta	Aumenta
	Superoxide dismutase 1	Aumenta	Disminuye

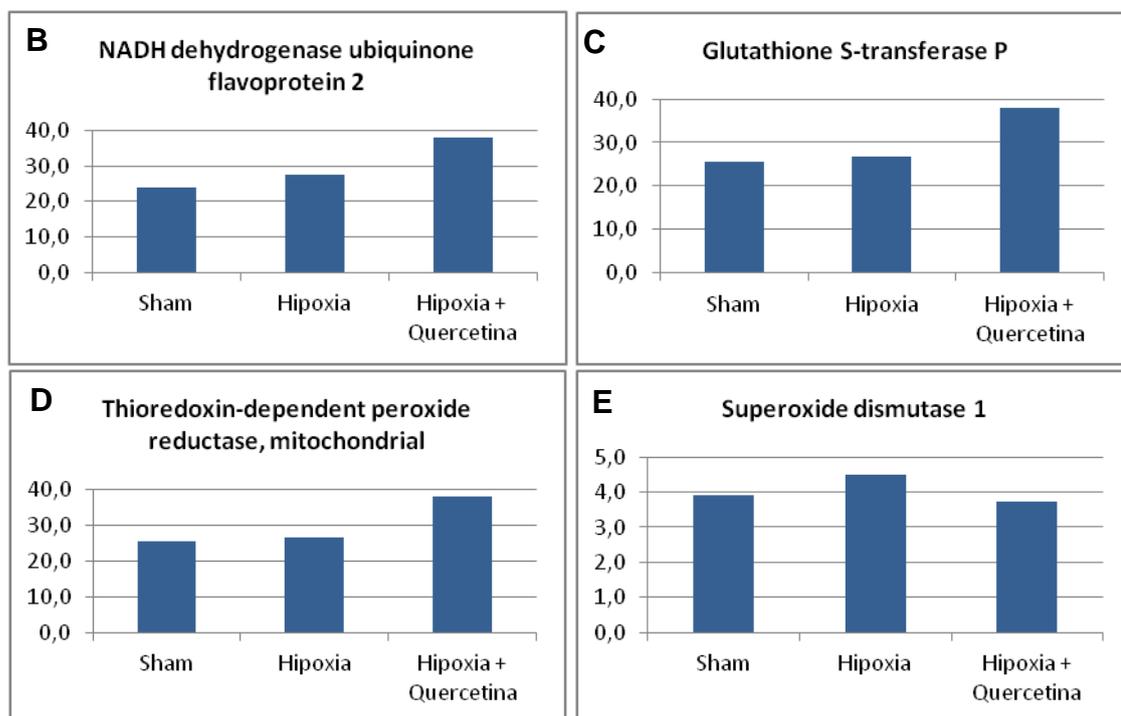
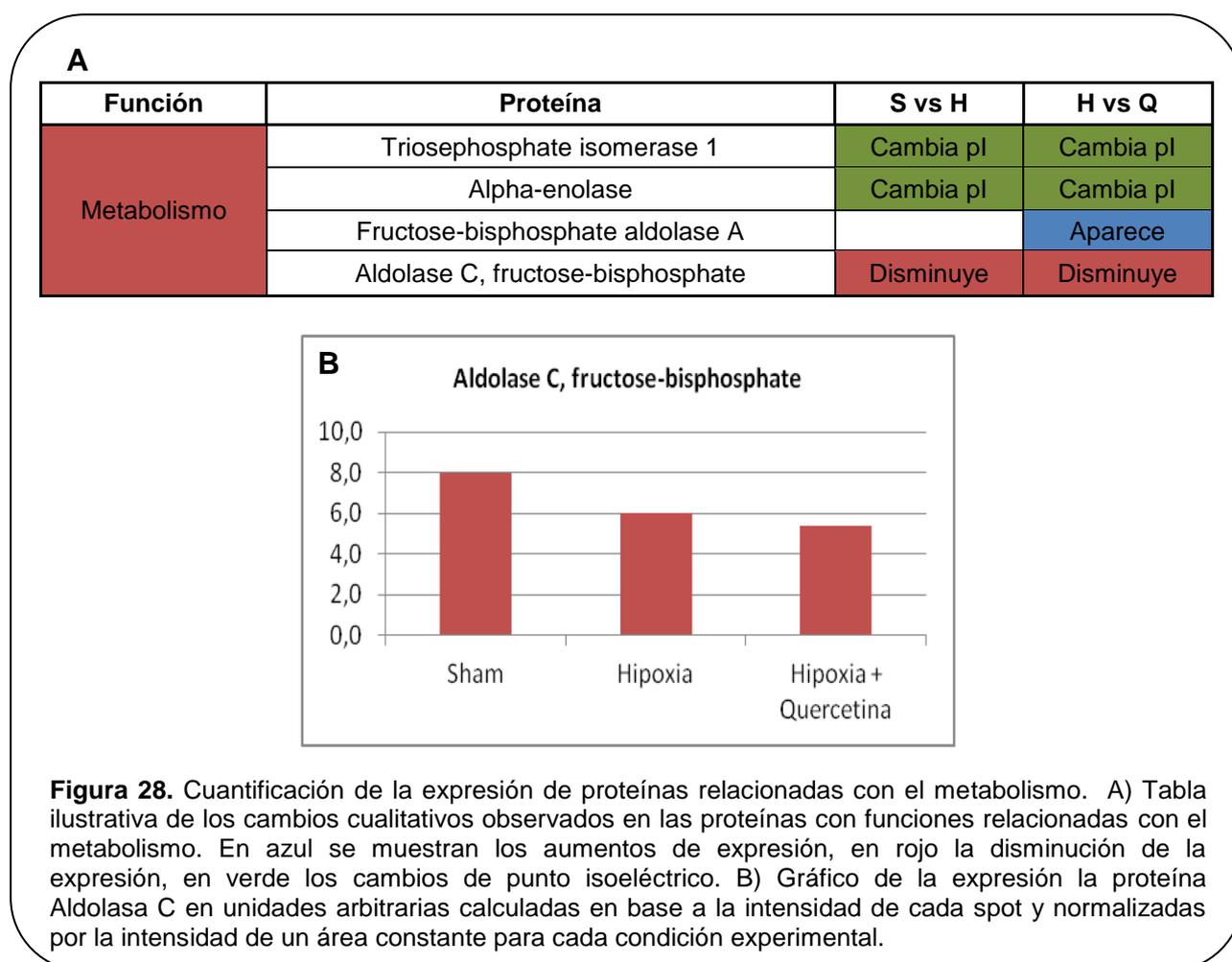


Figura 27. Cuantificación de la expresión de proteínas relacionadas con la Regulación Redox. A) Tabla ilustrativa de los cambios cualitativos observados en las proteínas con funciones relacionadas a la regulación redox. En azul se muestran los aumentos de expresión y en rojo la disminución de la expresión. B)-E) Gráficos de la expresión de cada proteína en unidades arbitrarias calculadas en base a la intensidad de cada spot y normalizadas por la intensidad de un área constante para cada condición experimental: B) NADH dehidrogenase ubiquinone flavoprotein 2, C) Glutathione S-transferase P, D) Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial, E) Superoxide dismutase 1.

Otro ejemplo es el de las proteínas vinculadas al metabolismo en las cuales tanto en los cerdos hipóxicos, como en los cerdos hipóxicos que recibieron quercetina éstas proteínas sufren en su mayoría modificaciones postraduccionales que hacen que cambie su punto isoeléctrico (figura 28). En el caso de la alfa enolasa y de la triosafosfato isomerasa 1 se recortaron dos spots de un mismo peso molecular, pero distinto punto

isoeléctrico, y el análisis por espectrofotometría de masas las identificó como la misma proteína. Cabe destacar, que para estas dos proteínas el cambio observado en el punto isoeléctrico en los cerdos que fueron sometidos a hipoxia respecto a los cerdos control revierte en los cerdos que fueron sometidos a hipoxia y que recibieron quercetina. En el caso de la Aldolasa A la situación es un poco diferente, ya que este spot aparecía solo en las muestras de cerdos hipóxicos con tratamiento con quercetina, y no en las otras dos condiciones experimentales. Evidentemente esto no significa que esta proteína no se expresa en los cerdos control y en los cerdos hipóxicos, sino que la explicación más probable es que este spot aparece allí en los geles de los cerdos hipóxicos que recibieron quercetina debido a modificaciones postraduccionales de la proteína que no se dan en las otras dos condiciones experimentales, y que si ocurren tras el tratamiento con quercetina.



En el caso de las proteínas relacionadas con la apoptosis, los cambios son diversos, y esto no necesariamente significa que los cambios son en direcciones opuestas, ya que el efecto que el aumento o disminución de una proteína dada tenga en la apoptosis va a depender de si dicha proteína es proapoptótica o antiapoptótica (figura 29).

A			
Función	Proteína	S vs H	H vs Q
Apoptosis	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Disminuye	Aumenta
	Prohibitin	Aumenta	No Cambia
	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Aumenta	Aumenta
	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A isoform X3	Disminuye	Aumenta

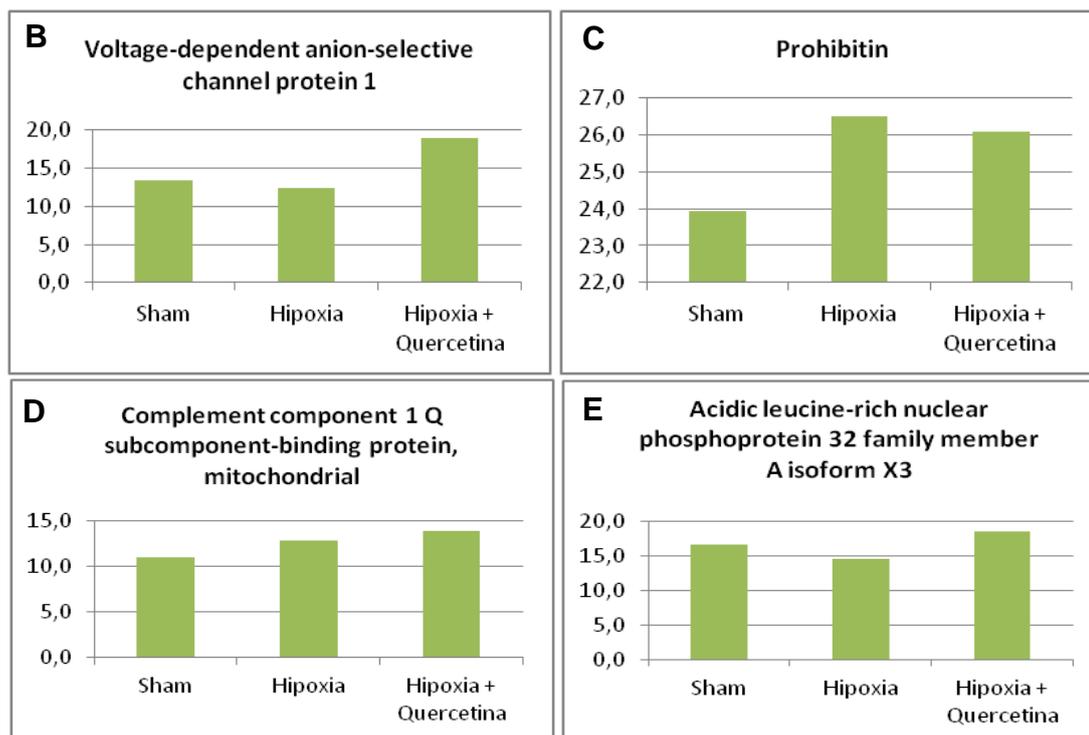


Figura 29. Cuantificación de la expresión de proteínas relacionadas con la Apoptosis. A) Tabla ilustrativa de los cambios cualitativos observados en las proteínas con funciones relacionadas a la apoptosis. En azul se muestran los aumentos de expresión y en rojo la disminución de la expresión. B)-E) Gráficos de la expresión de cada proteína en unidades arbitrarias calculadas en base a la intensidad de cada spot y normalizadas por la intensidad de un área constante para cada condición experimental: B) Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, C) Prohibitin, D) Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial, E) Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A isoform X3.

En el caso de las proteínas relacionadas con otras funciones como desarrollo del Sistema nervioso, citoesqueleto y regulación negativa de serina proteasas los cambios son diversos, pero interesantemente en todos los casos la quercetina revierte el cambio observado en respuesta a la hipoxia (figura 30).

A

Función	Proteína	S vs H	H vs Q
Citoesqueleto	Beta actin	Disminuye	Aumenta
	Cofilin-1	Disminuye	Aumenta
Desarrollo sistema nervioso	Glia maturation factor beta	Aumenta	Disminuye
	Sthathmin	Aumenta	Disminuye
Regulación Negativa de Serina Proteasas	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Aumenta	Disminuye

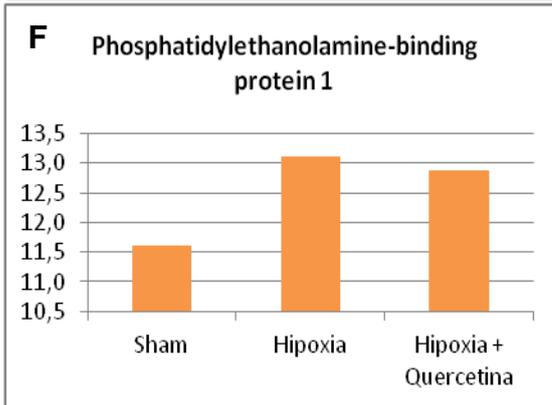
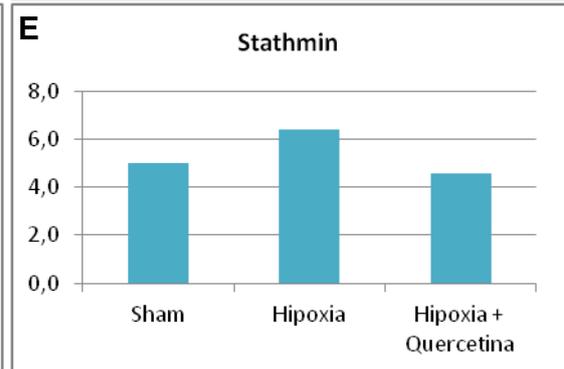
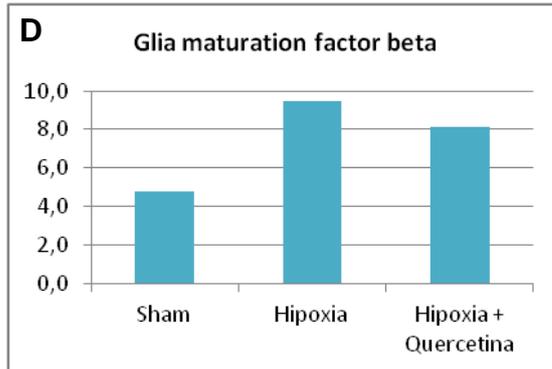
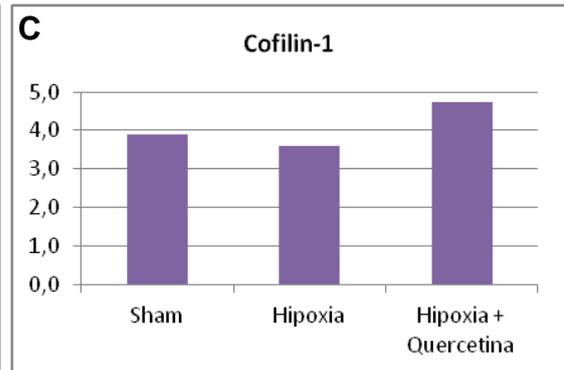
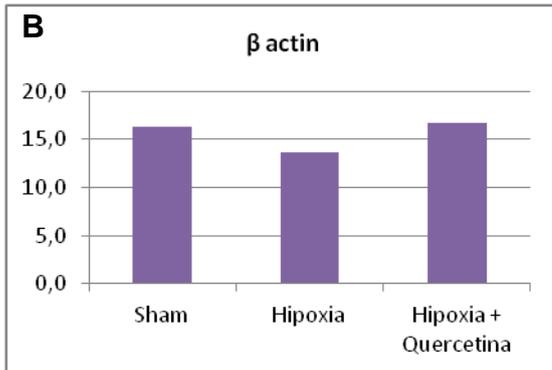


Figura 30. Cuantificación de la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, el desarrollo del sistema nervioso y la regulación negativa de serina proteasas. A) Tabla ilustrativa de los cambios cualitativos. En azul se muestran los aumentos y en rojo la disminución de la expresión. B)-F) Gráficos de la expresión de cada proteína en unidades arbitrarias calculadas en base a la intensidad de cada spot y normalizadas por la intensidad de un área constante para cada condición experimental: B) β -Actin, C) Cofilin-1, D) Glia maturation factor β , E) Sthathmin, F) Phosphatidylethanolamine-binding protein 1.

Discusión

En el presente trabajo nos propusimos encontrar identificadores a nivel molecular que permitieran la caracterización del daño por hipoxia aguda, así como del efecto del tratamiento con quercetina. Esta búsqueda de marcadores moleculares de interés se profundizó debido a que en el modelo de cerdo recién nacido sometido a hipoxia aguda, se ha demostrado que la quercetina mejora la hipotensión que se produce en las horas siguientes a la asfixia, y disminuye la necesidad de adrenalina para su tratamiento (Dajas et al. 2014). A nivel encefálico mejora la depresión de voltaje inducida por la hipoxia, que se evidencia en el monitoreo de la función cerebral de los cerdos a los que se les administró el preparado, en comparación con aquellos cerdos hipóxicos que no recibieron el tratamiento (Dajas et al. 2014).

Cambios de expresión a nivel de ARNm evidenciados por Real Time PCR

Los resultados obtenidos demuestran que los genes seleccionados para su análisis presentaron niveles que, aunque con distinta magnitud, cambian tras el tratamiento con quercetina (HO-1 HIF1- α , Nrf2), indicando una vía de trabajo para comprender la acción protectora de este flavonoide. Estos cambios no fueron en todos los casos homogéneos para las diferentes áreas del cerebro estudiadas. Así por ejemplo, Nrf2 mostró un aumento en los cerdos hipóxicos tratados con quercetina únicamente en estriado, pero no en corteza e hipocampo, mientras que HIF1- α mostró una gran disminución en los cerdos hipóxicos únicamente en corteza. Por otro lado, HO-1 mostró un menor nivel de expresión de su ARNm en los tres tejidos analizados tras el tratamiento con quercetina, si bien la magnitud de este cambio varió de acuerdo a las áreas, siendo la corteza la que mostró un mayor cambio en la expresión de HO-1 y estriado el que presentó el menor cambio.

De esto se desprende que las áreas del cerebro analizadas responden de forma diferente tanto a la hipoxia como al tratamiento con quercetina. El hecho de que las diferentes áreas del cerebro responden de forma diferente al daño hipóxico concuerda con los resultados descritos por otros autores. Ara et al. (2011) describió una mayor pérdida neuronal en la corteza, seguida del hipocampo y el estriado, mientras que los ganglios basales, el cerebelo y el tálamo se vieron afectados en menor medida. Por otro lado, Volpe et al. (1995) describió al hipocampo como un área de particular susceptibilidad a la injuria hipóxico-isquémica. Es claro que a nivel clínico la encefalopatía hipóxico isquémica comprende un abanico de patologías, que afectan en diferentes grados las

distintas zonas del cerebro, siendo la diplejía espástica la afectación más frecuente, y que el resultado final depende del tipo y grado de hipoxia inicial, de aspectos hemodinámicos locales, regionales y sistémicos, del género, del grado de madurez, de aspectos genéticos, lo que indica la complejidad que se enfrenta al intentar aclarar aspectos moleculares y seleccionar las estrategias terapéuticas apropiadas (Gressens & Hagberg 2012)

En nuestro modelo, tras la reanimación (y eventualmente inyección de preparado nanosomal de quercetina), los animales son mantenidos hasta transcurrir 8 horas del inicio de la hipoxia. Por lo que, para el análisis de los cambios en la expresión génica en el modelo utilizado, debemos tener en cuenta que las modificaciones observadas se realizan varias horas después del daño hipóxico o de la administración de quercetina, por lo que nos encontramos en la fase de latencia o fase II más allá de la fase de daño primario, no siendo posible la identificación los cambios que ocurren de forma inmediata.

Para los tres genes analizados hay datos muy variados acerca de la cinética de su inducción en diferentes modelos. Por ejemplo, en un modelo de isquemia cerebral focal permanente en ratas se encontró que 3 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media tanto el mensajero como la proteína de Nrf2 se encontraban aumentados, alcanzando su máxima expresión a las 24 horas (Yang et al. 2009). En el caso de HIF-1 α , un estudio del preconditionamiento hipóxico en cerdos recién nacidos (Ara et al. 2011), encontró que al cabo de 3 horas de hipoxia (8% O₂) tanto el mensajero como la proteína estaban significativamente aumentadas y el aumento persistía hasta 7 días post hipoxia en comparación con el control. Sin embargo, en diversos trabajos con diferentes modelos de hipoxia los autores afirman que el ARNm de HIF-1 α no varía durante la hipoxia (Crosson et al. 2005; Conde et al. 2012). Los trabajos que estudian la expresión de este gen luego de la hipoxia, son relativamente escasos lo cual agrega originalidad al trabajo realizado durante el desarrollo de esta monografía. Para describir con mayor exactitud la dinámica de los cambios de estos genes, sería necesario en un futuro analizar la cinética de expresión.

Por otro lado, los tres genes poseen funciones neuroprotectoras y es de esperar que durante la hipoxia estos genes aumenten su expresión. Además, los tres genes tienen antecedentes de ser inducidos por la quercetina (Wilson & Poellinger 2002; Jeon et al. 2007; Triantafyllou et al. 2007; Park et al. 2008; Myhrstad et al. 2002; Arredondo et al. 2010; Matsushima et al. 2009; Lin et al. 2004). En este sentido y en relación al factor de transcripción HIF-1, la quercetina inhibe la actividad de las prolihidroxilasas resultando en la estabilización de HIF-1 α y HIF-2 α y la activación de los genes de respuesta a hipoxia (Wilson & Poellinger 2002; Jeon et al. 2007; Triantafyllou et al. 2007; Park et al.

2008). También hay antecedentes de que este flavonoide induce la expresión de genes antioxidantes a través de la activación del factor de transcripción Nrf2 (Myhrstad et al. 2002; Arredondo et al. 2010). Este efecto fue demostrado *in vitro* en principio, y luego numerosos estudios han establecido este mecanismo como un blanco para la terapia en accidentes cerebrovasculares a través del uso de modelos experimentales de accidentes cerebrovasculares en roedores (Alfieri et al. 2011). La quercetina también ha sido reportada como un potente inductor de HO-1 en varios tipos celulares (Matsushima et al. 2009; Chow et al. 2005; Lin et al. 2004).

En el caso de HO-1, el aumento que vemos en los cerdos hipóxicos respecto a los cerdos control podría considerarse como parte de la respuesta del organismo a la hipoxia: aumentar los niveles de HO-1 para hacer frente al daño hipóxico. Sin embargo, un par de horas luego de la administración de quercetina vemos que la expresión de HO-1 se encuentra disminuida, llegando incluso a valores inferiores a los basales. Esta situación podría explicarse de diferentes formas. Por un lado, podría estar reflejando el hecho de que este gen ya actuó y su inducción se inactivó después de haber realizado su función como parte de un mecanismo de shut off celular, como suele verse en la respuesta a situaciones de estrés (McEwen 1998). Por otro lado, podría significar que la quercetina actuó mediante vías alternativas para disminuir el estrés oxidativo asociado al daño hipóxico, prescindiendo así de la inducción de HO-1, ya que, como vimos en la introducción la quercetina podría ejercer sus efectos protectores mediante la alteración de numerosas vías de señalización celular (Lee et al. 2008; Weng et al. 2011; Kim et al. 2010).

En cuanto a Nrf2, como vimos anteriormente, los niveles disponibles de proteína se regulan en gran medida a nivel postranscripcional, de forma dependiente de la estabilidad de la proteína y la localización subcelular. Por esta razón, la ausencia de un cambio significativo a nivel transcripcional en corteza e hipocampo no descarta su participación en la respuesta a la hipoxia o en la acción de la quercetina. Sin embargo, en estriado vemos que la administración de la quercetina provocó un aumento en el nivel de este mensajero, y se podría relacionar directamente con los mecanismos de acción de este neuroprotector. Si bien son más abundantes los ejemplos de regulación postranscripcional, numerosos trabajos describen aumento del ARNm en diversos modelos de hipoxia, así como en otros estímulos del tipo oxidativo (Sethy et al. 2011; Polotsky et al. 2010; Hedtjörn et al. 2004; Leonard et al. 2006; Y. Chen et al. 2009; P.C. Chen et al. 2009). La vía de Nrf2 en algunos tejidos podría entonces considerarse una de las vías sobre la cual la quercetina actúa y ejerce su efecto neuroprotector. Ciertos autores, como Arredondo et al. 2010, han demostrado que la quercetina es capaz de inducir la translocación al núcleo de Nrf2, y que la administración de quercetina en

cultivos primarios de granos de cerebelo previene la muerte celular frente a H₂O₂.

El hecho de que HIF se encuentre disminuido en los cerdos que fueron sometidos a hipoxia podría evidenciar que la inducción de HIF-1 α en respuesta a la hipoxia al cabo de 8 horas de recuperación se apagó. Esto es planteable dado que la inducción prolongada de este gen y su producto podría resultar dañina para las células, y se conocen algunos mecanismos por los cuales una vez inducida la proteína es capaz de afectar la transcripción de genes cuya principal función es la de regular negativamente la expresión de HIF-1 α . Así, por ejemplo, dentro de los genes blanco de HIF-1 se encuentran las PHD, cuya transcripción aumenta como resultado de la estabilización y activación de HIF-1. Esta regulación positiva de las PHD mediada por HIF-1 funciona como un mecanismo de retroalimentación negativo responsable de la degradación aumentada de HIF-1 α después de la reoxigenación. Es decir que funciona como un shut-off de la respuesta a la hipoxia una vez que la tensión de oxígeno se restablece (Berra et al. 2003; Cioffi et al. 2003; Vengellur et al. 2003; Erez et al. 2004). Se ha reportado en una variedad de modelos que en la reoxigenación, HIF-1 α es translocado nuevamente al citosol donde es rápidamente degradado por el proteasoma (Chilov et al. 1999; Groulx & Lee 2002; Kallio et al. 1998). Sin embargo, en contraposición a esto, ciertos autores han establecido que en algunos modelos excepcionales HIF-1 α se acumula incluso durante la etapa de reperfusión y/o reoxigenación a través de la vía de señalización PI3k/Akt-mTOR (Natarajan et al. 2005; Conde et al. 2012).

Por otro lado, la ausencia de grandes cambios de los niveles de expresión observados en hipocampo y en estriado no descartan la participación de HIF-1 α en la respuesta a la hipoxia y/o a la quercetina, ya que de forma similar a lo que veíamos con Nrf2, HIF-1 α también es regulada principalmente a nivel postraduccional.

Cambios de expresión a nivel proteico evidenciados por Western Blot

Debido a la fuerte regulación postranscripcional a la que están sometidas dos de las proteínas estudiadas (Nrf2 y HIF-1 α) resultaba de particular interés estudiar los niveles de expresión de estos factores de transcripción a nivel proteico, y en el caso de HO-1 poder estudiar si los cambios observados a nivel del mensajero se correlacionan con los niveles proteicos. Sin embargo, debido a la baja reproducibilidad en la obtención de bandas no fue posible la cuantificación de los niveles de proteína mediante esta técnica. Hipotetizamos que las dificultades experimentadas con el abordaje experimental de Western Blot se debe en gran parte al bajo nivel de expresión de las proteínas (en el caso de Nrf2 y HIF-1 α) aún cuando son inducidas, la falta de anticuerpos específicos contra las proteínas de cerdo y a las características del propio tejido y las muestras con

las que trabajamos.

De forma cualitativa fue posible observar en la corteza una menor expresión de HIF-1 α en los cerdos sometidos a hipoxia, en comparación con los otros grupos experimentales, y que la quercetina restableció al nivel "basal" de expresión de la proteína. Es decir, que el patrón de expresión proteica observado en los grupos experimentales reproduce el patrón de expresión observada para el mensajero.

Los genes analizados, tanto a nivel de ARNm como de proteína, fueron seleccionados en base al rol crítico que juegan en el desencadenamiento de respuestas citoprotectoras frente a la hipoxia y al estrés oxidativo, sin embargo, es difícil prever cuáles serán los genes claves en el modelo utilizado basándose únicamente en los antecedentes y la bibliografía. El abordaje utilizado para esta primera parte del trabajo, si bien es útil, resulta bastante específico y un tanto sesgado, por esta razón, se decidió utilizar un abordaje proteómico, el cual ofrece una gran riqueza en cuanto a resultados, y es menos restringida en cuanto a los productos génicos interrogados.

Análisis del perfil proteico por Electroforesis bidimensional

Este enfoque permitió identificar las principales vías afectadas tras el daño inducido por hipoxia, así como por el tratamiento con la quercetina. A su vez, pone en evidencia el hecho de que el efecto neuroprotector de la quercetina determina cambios en el perfil proteico celular.

El aumento en proteínas involucradas en la regulación redox que se evidencia luego de la hipoxia podría considerarse como parte de la respuesta celular frente al estrés oxidativo que genera la hipoxia y reoxigenación. En particular, la glutatión S transferasa, la peróxido reductasa dependiente de tioredoxina, y la superóxido dismutasa son proteínas con funciones antioxidantes y podrían verse aumentadas de forma de contrarrestar el daño oxidativo. Está descrito que la sobreexpresión y/o el aumento de expresión de estas proteínas está vinculado a la protección celular frente a diversos estímulos del tipo oxidativo (Masaki et al. 2003; Nonn et al. 2003; Dimmeler et al. 1999; Yin et al. 2000). La quercetina contribuye a esa respuesta, aumentando aún más la expresión de estas proteínas antioxidantes en el caso de la glutatión S transferasa y la peróxido reductasa dependiente de tioredoxina. En el caso de la Superóxido dismutasa 1 lo que se ve es una disminución en los cerdos sometidos que recibieron quercetina con respecto a los cerdos que no fueron tratados y podría explicarse por una atenuación del estrés oxidativo por parte de la quercetina que haga que elevar los niveles de esta proteína ya no sea tan necesario.



Con respecto a la proteína NADH dehidrogenasa ubiquinone flavoprotein 2, es una subunidad del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial, que cumple la función de transferencia de electrones desde el NADH hacia la cadena respiratoria. Por un lado, este complejo sería una fuente de ROS durante la hipoxia, contribuyendo así a la injuria oxidativa. Por otro lado, se ha visto que la hipoxia/reoxigenación producen una inhibición de la actividad de este complejo (Niatsetskaya et al. 2012). Por lo que se dificulta predecir qué efecto puede tener un cambio en la expresión de esta proteína, y dependerá de si el complejo se encuentra inhibido o no.

Es interesante que las proteínas que cambian su punto isoeléctrico, estén vinculadas a la glucólisis. Es decir, que tanto la hipoxia como el efecto de la quercetina determina ciertas modificaciones postraduccionales en las proteínas implicadas en esta vía, y que estos cambios en el caso de la enolasa y de la triosafosfato isomerasa son en direcciones opuestas, es decir que la hipoxia determina modificaciones que hace que el punto isoeléctrico de estas proteínas aumente, y que las modificaciones inducidas por el efecto de la quercetina hacen que el punto isoeléctrico de estas proteínas disminuya a valores similares a los que se ven en los cerdos control. Esto podría significar que una modificación post traduccional ocurrida durante la hipoxia, evento que se acompaña de un aumento de la actividad en las vías glucolíticas, podría revertirse con el tratamiento con quercetina. Evidentemente se requieren más estudios para poder establecer cuáles son esas modificaciones y que rol pueden estar jugando ya sea en la respuesta a la hipoxia como en la acción de la quercetina. Esta determinación se puede realizar con otros abordajes experimentales que permitan identificar dichas modificaciones en espectrómetro de masas con suficiente exactitud. En la bibliografía se ha reportado la inducción mediada por la hipoxia de varias de estas proteínas, y se cree que el fin de esta inducción es la de aumentar la producción energética anaeróbica (Yamaji et al. 2004; Jean et al. 2006; Semenza et al. 1996).

Se encontraron varias proteínas relacionadas con la apoptosis. Esta descrito en la bibliografía que la quercetina induce la apoptosis dependiente de p53 (Kim et al. 2010) y modula varios blancos de las vías celulares de transducción de señales relacionadas con la apoptosis y la proliferación celular, por ejemplo regula negativamente las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-XL y Bcl-2) y regula positivamente los miembros proapoptóticos Bax y Bad (Chen et al. 2005; Vijayababu et al. 2005). También se ha demostrado que la quercetina induce la apoptosis a través de mecanismos dependientes de caspasa 3 y caspasa 9 al liberar el citocromo c (Wang et al. 1999; Russo et al. 1999). La inducción de la apoptosis no necesariamente constituye un agravio, ya que es una estrategia fisiológica de selección de células durante el desarrollo

y también ocurre en la zona penumbra de lesiones isquémicas para rescatar el tejido, eliminando las células irreversiblemente dañadas, por lo que el efecto neuroprotector puede acompañarse tanto de inducción o inhibición de la apoptosis.

En el presente trabajo, las dos proteínas relacionadas con la apoptosis que aumentan luego de la hipoxia y con el tratamiento con quercetina (prohibitina y Complement component 1Q subcomponent binding protein) se relacionan con una inhibición de la apoptosis y protección frente a daño oxidativo en la bibliografía. En el caso de la prohibitina está descrito como un factor de supervivencia frente a la muerte celular inducida por la hipoxia. El mecanismo de supervivencia detrás de la sobreexpresión de la prohibitina en condiciones hipóxicas se debe a la inhibición de la disminución del potencial de membrana mitocondrial, a una disminución de los niveles de Bcl-2 en la mitocondria, y a la inhibición de la liberación de citocromo C de la mitocondria (Muraguchi et al. 2010). En este modelo de hipoxia pudimos constatar que la prohibitina aumenta su expresión, y se mantiene aumentada luego de la expresión de la quercetina.

Se cree que la proteína Complement component 1Q subcomponent binding protein forma parte del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, y se ha descrito que niveles aumentados de esta proteína se relacionan con la supresión de la muerte celular inducida por insultos oxidativos (por ejemplo peróxido de hidrógeno). El Knockdown de la expresión de esta proteína se vincula a una mayor sensibilidad a la muerte inducida por estos agentes oxidantes. Por lo tanto se hipotetiza que esta proteína actuaría como un inhibidor endógeno del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, y protegería así a las células frente al estrés oxidativo (McGee & Baines 2011; McGee et al. 2011). En este modelo de hipoxia pudimos constatar que C1qbp aumenta su expresión luego de la hipoxia, y se mantiene aumentada luego de la administración de la quercetina, lo que se podría relacionar a una inhibición de la apoptosis.

Respecto a la proteína 1 del Canal dependiente de voltaje anión selectivo se conoce que puede participar en la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial responsable de la liberación de productos mitocondriales que activan la apoptosis, y es reconocida como una proteína clave en la apoptosis mediada por la mitocondria. En realidad, esta proteína es muy controversial, se sabe que está relacionada con la apoptosis, pero aún no se conoce a ciencia cierta los mecanismos subyacentes, y los diferentes autores proponen mecanismos diferentes y hasta opuestos (Galluzzi & Kroemer 2007). Se han observado además, modificaciones como la fosforilación en tirosina inducida por la hipoxia que afectaría la función de dicha proteína y la capacidad de interactuar con otras proteínas (Liberatori et al. 2004), y formas truncadas de la proteína inducidas por la hipoxia que conferirían protección de la apoptosis y que

permitirían la supervivencia celular en hipoxia (Brahimi-Horn et al. 2012).

En cuanto a la proteína Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A, si bien se conoce poco acerca de esta proteína, se cree que además de cumplir funciones en el control del ciclo celular, es una proteína antiapoptótica capaz de regular a la caspasa 3. Su efecto en la apoptosis se ha estudiado en relación a diversos tipos de cáncer y en relación a la sensibilidad a las terapias para dicha enfermedad, no habiendo aún consenso sobre el carácter pro o antiapoptótico de esta proteína (Kuramitsu et al. 2010; Schafer et al. 2006; Hoffarth et al. 2008). En nuestro trabajo encontramos esta proteína disminuida en los cerdos que fueron sometidos a hipoxia con respecto a los cerdos control, mientras que tras el tratamiento con quercetina la expresión de esta proteína aumenta.

Se sabe que la hipoxia genera cambios a nivel del citoesqueleto, la forma y la movilidad celular (Ostergaard et al. 2009; Vogler et al. 2013). Los cambios que vemos en proteínas del citoesqueleto ciertamente son un reflejo de ello, y es importante destacar que los cambios observados en las dos proteínas del citoesqueleto luego de la hipoxia, revierten luego del tratamiento con quercetina.

Con respecto al factor de maduración glial β , esta proteína juega un rol importante en la diferenciación, el mantenimiento y la regeneración del sistema nervioso. En el trabajo de Pantazis et al. 2000 se demostró que esta proteína regula positivamente la expresión de BDNF y NGF, y que estos factores ejercen funciones neurotróficas y neuroprotectoras en cultivo de neuronas primarias. En nuestro trabajo pudimos constatar que esta proteína se induce con la hipoxia, y la expresión de esta proteína continúa aumentada aún luego de la administración de la quercetina.

En cuanto, a las proteínas, PBEB1 y estatmina, no existe prácticamente en la bibliografía vinculación con la hipoxia ni con la quercetina. De confirmarse nuestros resultados, estaríamos contribuyendo a la caracterización de las funciones de estas proteínas.

Si bien este abordaje permitió identificar potenciales candidatos, se requiere de más estudios para determinar con precisión la relación de las proteínas identificadas con el daño y/o la respuesta a la hipoxia y con el efecto neuroprotector de la quercetina. Además, sería beneficioso estudiar los cambios proteicos en respuesta a la hipoxia y a la quercetina a menores y mayores tiempos de sobredida que profundizaran en los cambios moleculares de todas las etapas de esta compleja patología.

Es interesante además que un gran número de las proteínas identificadas (NADH



dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 2, Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial, Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, Prohibitin, Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial) son proteínas mitocondriales, reafirmando a este organelo como uno de central importancia en la patología de los eventos hipóxicos.

Además de caracterizar los cambios en el perfil proteico luego del evento hipóxico, así como luego de la administración con quercetina, este trabajo logró identificar nuevos posibles blancos de la quercetina, ya que a muchas de estas proteínas no se les conocía una vinculación con este compuesto y con su mecanismo de acción.

Conclusiones

El modelo de cerdo recién nacido resultó muy adecuado para el estudio propuesto, puesto que los resultados moleculares se acompañaron del correlato de datos de hemodinamia, actividad cerebral y anatomía patológica que dan registro tanto del daño por la hipoxia como de la posible recuperación. Sin embargo, constatamos una gran variabilidad intrínseca del modelo de estudio, tanto por el tipo de animal, su respuesta fisiológica compleja, la plasticidad y fragilidad del recién nacido y por el tratamiento al que responde de manera individual.

En cuanto a la expresión de los genes seleccionados, tras 8 horas del comienzo de la hipoxia en corteza parece existir un aumento de HO-1 y una disminución de HIF-1 α . La quercetina también afecta la expresión de estos genes. En particular, produce un aumento del ARNm de Nrf2 en estriado y HIF-1 α en todas las áreas estudiadas, y una disminución de HO-1 en todas las áreas estudiadas. Estos resultados a nivel del ARNm parecen corresponderse con los niveles de proteína en el caso de HIF-1 α , si bien los ensayos de western blot dieron resultados poco definitivos. Las distintas áreas estudiadas se comportan de forma diferente, particularmente el estriado donde se observa una menor disminución de la expresión relativa de HO-1, y un aumento del ARNm de Nrf2 en los cerdos tratados con quercetina.

El análisis del perfil proteómico demostró nuevamente que varios de los cambios de expresión ocurridos con la hipoxia revierten con el tratamiento con quercetina. Las proteínas seleccionadas durante el análisis proteómico pudieron relacionarse con algunas vías indicando que éstas serían las principales implicadas en el daño y en las que la quercetina ejercería su acción restauradora. Estas son fundamentalmente el metabolismo, la regulación del estado redox celular y el estrés oxidativo, y la apoptosis. La identificación de tales proteínas marcadoras *in vivo* permite profundizar en el vínculo entre los efectos protectores de los flavonoides y la alteración de la expresión génica lo que posibilita el estudio de blancos que puedan ser explotados en el desarrollo de nuevas terapias.

Perspectivas

De los animales sometidos al protocolo experimental, aún conservamos las muestras de cerebelo de cerdos sometidos a hipoxia con y sin el tratamiento con quercetina. Sería interesante realizar al análisis de la expresión de los tres genes estudiados en este tejido, de forma de obtener un panorama más completo del patrón de expresión de estos genes a nivel del Sistema Nervioso Central, y comparar el comportamiento y tendencia con el de los demás tejidos estudiados.

El mismo protocolo experimental fue realizado manteniendo los cerdos vivos durante 72 horas. Este diseño fue pensado para analizar la evolución de los animales tras la hipoxia y el tratamiento, así como los efectos a nivel histopatológico y fisiológico, que muchas veces no se manifiestan en pocas horas. Se encontró que en los cerdos de 72 horas de sobrevivida, aquellos tratados con quercetina recuperan la capacidad de respirar espontáneamente antes que los animales sin tratamiento, se pueden extubar en su mayoría a las 24 horas, un mayor porcentaje de cerdos succionan y pueden alimentarse, un mayor porcentaje de cerdos deambulan a las 72hs y el monitoreo de función cerebral les mejora con respecto al grupo de sólo hipoxia. En estas muestras, de las que disponemos, sería interesante estudiar la expresión de Nrf2, HIF-1 α , y HO-1 y de esta forma determinar los cambios en la expresión génica a más largo plazo, y como las diferentes condiciones experimentales afectan su expresión.

Dentro del trabajo de esta tesina, también se realizó una búsqueda bibliográfica de otros genes que pudieran estar implicados en la respuesta a la hipoxia y al tratamiento con la quercetina, encontrando al gen de la Neuroglobina como un buen candidato. Por lo cual, se procedió al diseño y obtención de los cebadores para este mensajero y a la puesta a punto de la reacción de PCR en tiempo final y en tiempo real, faltando aún analizar la expresión de este gen.

Frente a las dificultades experimentadas con el ensayo de western blot, sería interesante poder estudiar la expresión de HIF-1 α y Nrf2 mediante inmunohistoquímica. La sensibilidad de técnicas inmunofluorescentes puede arrojar resultados que fueron difíciles con el western blot. De esta forma, podríamos visualizar en el caso de HIF-1 α y Nrf2, si la proteína en cuestión fue inducida o no y cambios en su localización celular. Podríamos asimismo describir con certeza cuáles son las regiones dentro del SNC en donde los cambios de expresión son más marcados. Disponemos de algunas muestras en bloque de parafina como para emprender este estudio.



Como se mencionó anteriormente, los resultados de electroforesis bidimensional presentados aquí son muy prometedores, pero preliminares, siendo necesario aún repetir el experimento con nuevas réplicas biológicas y así obtener resultados más sólidos y con significancia estadística. De hecho, existen software específicos para el análisis de “spots” diferenciales, que requieren un mayor número de datos para su aplicación correcta. A su vez, se planea emplear esta técnica con las muestras de cerdo de 72 horas de sobrevida. Este estudio se podría confirmar y analizar en más detalle mediante el análisis por PCR en tiempo real de las proteínas que presenten grandes cambios en su expresión. Dado que pudieron identificarse algunas vías particulares donde se centraría la acción de la quercetina, nuestro interés es analizarlas en mayor profundidad.

Bibliografía

- Abraham, N.G. et al., 1996. *The Biological Significance and Physiological Role of Heme Oxygenase*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 6(3), pp.129–168.
- Abraham, N.G. & Kappas, A., 2008. *Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase*. , 60(1), pp.79–127.
- Abraham, N.G., Scapagnini, G. & Kappas, A., 2003. *Human heme oxygenase: cell cycle-dependent expression and DNA microarray identification of multiple gene responses after transduction of endothelial cells*. *Journal of cellular biochemistry*, 90(6), pp.1098–111.
- Ahlström, K. et al., 2009. *Metabolic responses in ischemic myocardium after inhalation of carbon monoxide*. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 53(8), pp.1036–42.
- Alam, J., 2002. *Heme oxygenase-1: past, present, and future*. *Antioxidants & redox signaling*, 4(4), pp.559–62.
- Alam, J. & Cook, J.L., 2003. *Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway*. *Current pharmaceutical design*, 9(30), pp.2499–511.
- Alfieri, A. et al., 2011. *Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke*. *The Journal of physiology*, 589(Pt 17), pp.4125–36.
- Ara, J. et al., 2011. *Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain*. *Neurobiology of disease*, 43(2), pp.473–85.
- Arab, L. & Liebeskind, D.S., 2010. *Tea, flavonoids and stroke in man and mouse*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1), pp.31–6.
- Arredondo, F. et al., 2010. *After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult*. *Free radical biology & medicine*, 49(5), pp.738–47.
- Arts, I.C.W. & Hollman, P.C.H., 2005. *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), p.317S–325S.
- Azzopardi, D., 2010. *Hypoxic ischaemic encephalopathy in newborn infants*. *Early human development*, 86(6), p.327.
- Baranano, D.E. et al., 2002. *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), pp.16093–8.
- Barks, J.D. & Silverstein, F.S., 1992. *Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury*. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 2(3), pp.235–43.
- Benveniste, H. et al., 1984. *Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis*. *Journal of neurochemistry*, 43(5), pp.1369–74.
- Beretz, A. et al., 1982. *Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin*. *Biochemical pharmacology*, 31(22), pp.3597–600.
- Berra, E. et al., 2003. *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia*. *The EMBO journal*, 22(16), pp.4082–90.
- Bischoff, S.C., 2008. *Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease*. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 11(6), pp.733–40.
- De Boer, V.C.J. et al., 2005. *Tissue distribution of quercetin in rats and pigs*. *The Journal of nutrition*, 135(7), pp.1718–25.
- Brahimi-Horn, M.C. et al., 2012. *Expression of a truncated active form of VDAC1 in lung cancer associates with hypoxic cell survival and correlates with progression to chemotherapy resistance*. *Cancer research*, 72(8), pp.2140–50.
- Brennan, A.M. et al., 2009. *NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation*. *Nature neuroscience*, 12(7), pp.857–63.
- Brorson, J.R., Schumacker, P.T. & Zhang, H., 1999. *Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production*. *The Committees on Neurobiology and Cell Physiology. The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(1), pp.147–58.
- Bruick, R.K. & McKnight, S.L., 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (New York, N. Y.)*, 294(5545), pp.1337–40.
- Buonocore, G. et al., 2012. New pharmacological approaches in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Current pharmaceutical design*, 18(21), pp.3086–100.
- Carbajal Ugarte, J.A. & Pastrana Huanaco, E., 2002. Valor predictivo de asfixia perinatal en niños nacidos de mujeres con riesgo obstétrico. *Revista mexicana de pediatría*, 69(1), pp.10–13.
- Cassidy, A. et al., 2012. Dietary flavonoids and risk of stroke in women. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 43(4), pp.946–51.
- Chan, J.Y., Han, X.L. & Kan, Y.W., 1993. Isolation of cDNA encoding the human NF-E2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), pp.11366–70.
- Chan, P.H., 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(1), pp.2–14.
- Chandel, N.S. et al., 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), pp.11715–20.
- Chandel, N.S. & Schumacker, P.T., 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 88(5), pp.1880–9.
- Chang, W.S. et al., 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer research*, 13(6A), pp.2165–70.
- Chen, C.M., Liu, S.H. & Lin-Shiau, S.Y., 2007. Honokiol, a neuroprotectant against mouse cerebral ischaemia, mediated by preserving Na⁺, K⁺-ATPase activity and mitochondrial functions. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 101(2), pp.108–16.
- Chen, D. et al., 2005. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochemical pharmacology*, 69(10), pp.1421–32.
- Chen, K., Gunter, K. & Maines, M.D., 2000. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *Journal of neurochemistry*, 75(1), pp.304–13.
- Chen, P.C. et al., 2009. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), pp.2933–8.
- Chen, Y. et al., 2009. Microarray analysis of gene expression in rat cortical neurons exposed to hyperbaric air and oxygen. *Neurochemical research*, 34(6), pp.1047–56.
- Chilov, D. et al., 1999. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *Journal of cell science*, 112 (Pt 8), pp.1203–12.
- Cho, H.Y. et al., 2002. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 26(2), pp.175–82.
- Cho, H.Y. et al., 2004. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(11), pp.1258–60.
- Cho, J.Y. et al., 2006. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience letters*, 404(3), pp.330–5.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8), pp.623–34.
- Choi, D.W. & Rothman, S.M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience*, 13, pp.171–82.
- Chow, J.M. et al., 2005. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochemical pharmacology*, 69(12), pp.1839–51.
- Chowdhury, R. et al., 2011. Studies on the reaction of nitric oxide with the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain 2 (EGLN1). *Journal of molecular biology*, 410(2),

- pp.268–79.
- Cioffi, C.L. et al., 2003. *Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. Biochemical and biophysical research communications*, 303(3), pp.947–53.
- Clark, J.E. et al., 2000. *Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. The Biochemical journal*, 348 Pt 3, pp.615–9.
- Clemens, J.A., 2000. *Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. Free radical biology & medicine*, 28(10), pp.1526–31.
- Coleman, C.N., Mitchell, J.B. & Camphausen, K., 2002. *Tumor hypoxia: chicken, egg, or a piece of the farm? Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(3), pp.610–5.
- Conde, E. et al., 2012. *Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. PloS one*, 7(3), p.e33258.
- Cowan, F. et al., 2003. *Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy. Lancet*, 361(9359), pp.736–42.
- Coyle, J.T. & Puttfarcken, P., 1993. *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science (New York, N.Y.)*, 262(5134), pp.689–95.
- Crosson, L. et al., 2005. *Time Course of Hypoxia Inducible Factor-1 alpha (HIF-1{alpha}) mRNA and Protein Levels in Rat Retina. ARVO Meeting Abstracts*, 46(5), p.5172.
- Dajas, F. et al., 2003b. *Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. Neurotoxicity research*, 5(6), pp.425–32.
- Dajas, F. et al., 2005. *Flavonoids and the Brain: Evidences and Putative Mechanisms for a Protective Capacity. Current Neuropharmacology*, 3(3), pp.193–205.
- Dajas, F. et al., 2014. *Nanosomal preparation of the complex formed by quercetin (or another flavonol, flavone or a derivative thereof) and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin for intravenous use in cerebral pathological conditions. Patente WO 2014054005 A2.*
- Dajas, F. et al., 2003a. *Neuroprotection by flavonoids. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica*, 36(12), pp.1613–20.
- Dajas F, Rivera F, Blasina F, Urbanavicius J, Arredondo F, Lafon L, Costa G, Echeverry C, Ferreira M & Morquio A., 2002. *Mechanisms of neuroprotection. The contribution of quercetin in focal ischemia and cell culture. XVII Annual Meeting of the Federação de Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental (FESBE), Salvador, BA, Brazil, August 28-31, Abstract 1241*
- Denko, N.C. et al., 2003. *Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. Oncogene*, 22(37), pp.5907–14.
- Dickerson, J.W. & Dobbing, J., 1966. *Some peculiarities of cerebellar growth in pigs. Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 59(11 Part 1), p.1088.
- Dimmeler, S. et al., 1999. *Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(3), pp.656–664.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A., 1999. *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends in neurosciences*, 22(9), pp.391–7.
- Dirscherl, K. et al., 2010. *Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. Journal of neuroinflammation*, 7, p.3.
- Dixon, G. et al., 2002. *Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. Pediatrics*, 109(1), pp.26–33.
- Duffy, S., So, A. & Murphy, T.H., 1998. *Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. Journal of neurochemistry*, 71(1), pp.69–77.
- Dugan, L.L. & Choi, D.W., 1994. *Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. Annals of neurology*, 35 Suppl, pp.S17–21.
- Edwards, A.D. et al., 2010. *Neurological outcomes at 18 months of age after moderate*

- hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data.* *BMJ (Clinical research ed.)*, 340, p.c363.
- Epstein, A.C. et al., 2001. *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.* *Cell*, 107(1), pp.43–54.
- Erez, N. et al., 2004. *Hypoxia-dependent regulation of PHD1: cloning and characterization of the human PHD1/EGLN2 gene promoter.* *FEBS letters*, 567(2-3), pp.311–5.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. & Talalay, P., 2001. *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants.* *Phytochemistry*, 56(1), pp.5–51.
- Fahey, J.W., Zhang, Y. & Talalay, P., 1997. *Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), pp.10367–72.
- Fandrey, J., Gorr, T.A. & Gassmann, M., 2006. *Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation.* *Cardiovascular research*, 71(4), pp.642–51.
- Fisher, T.S. et al., 2005. *Analysis of ARD1 function in hypoxia response using retroviral RNA interference.* *The Journal of biological chemistry*, 280(18), pp.17749–57.
- Fondevila, C. et al., 2004. *Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury.* *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(6), pp.1333–41.
- Foresti, R. et al., 1999. *Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis.* *The Biochemical journal*, 339 (Pt 3), pp.729–36.
- Fraga, C.G., 2007. *Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions.* *IUBMB life*, 59(4-5), pp.308–15.
- Fujiki, H. et al., 1986. *Inhibition of tumor promotion by flavonoids.* *Progress in clinical and biological research*, 213, pp.429–40.
- Galli, R.L. et al., 2002. *Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits.* *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, pp.128–32.
- Galluzzi, L. & Kroemer, G., 2007. *Mitochondrial apoptosis without VDAC.* *Nature cell biology*, 9(5), pp.487–9.
- Gong, Y. & Agani, F.H., 2005. *Oligomycin inhibits HIF-1 α expression in hypoxic tumor cells.* *American journal of physiology. Cell physiology*, 288(5), pp.C1023–9.
- Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M.P., 2010. *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1.* *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, pp.323–54.
- Gressens, P. & Hagberg, H., 2012. *Perinatal Brain Damage: Mechanisms and Neuroprotective Strategies.* *Journal of the Indian Institute of Science*, 92(4), pp.465–484.
- Groulx, I. & Lee, S., 2002. *Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.* *Molecular and cellular biology*, 22(15), pp.5319–36.
- Gryglewski, R.J. et al., 1987. *On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids.* *Biochemical pharmacology*, 36(3), pp.317–22.
- Gunaratnam, L. & Bonventre, J. V., 2009. *HIF in kidney disease and development.* *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(9), pp.1877–87.
- Gutierrez-Merino, C. et al., 2011. *Neuroprotective actions of flavonoids.* *Current medicinal chemistry*, 18(8), pp.1195–212.
- Guzy, R.D. et al., 2005. *Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing.* *Cell metabolism*, 1(6), pp.401–8.
- Han, B.H. et al., 2002. *Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury.* *The Journal of biological chemistry*, 277(33), pp.30128–36.
- Hara, M.R. & Snyder, S.H., 2007. *Cell signaling and neuronal death.* *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp.117–41.
- Hayes, J.D. & McMahon, M., 2001. *Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention.* *Cancer letters*, 174(2), pp.103–13.
- Hedtjárn, M. et al., 2004. *Global gene expression in the immature brain after hypoxia-ischemia.* *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(12), pp.1317–32..

- Hochachka, P.W. & Lutz, P.L., 2001. *Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 130(4), pp.435–59.
- Hoffarth, S. et al., 2008. *pp32/PHAPI determines the apoptosis response of non-small-cell lung cancer. Cell death and differentiation*, 15(1), pp.161–70.
- Hogenesch, J.B. et al., 1997. *Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. The Journal of biological chemistry*, 272(13), pp.8581–93.
- Hollman, P.C.H., Geelen, A. & Kromhout, D., 2010. *Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. The Journal of nutrition*, 140(3), pp.600–4.
- Huang, Z.J., Ederly, I. & Rosbash, M., 1993. *PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. Nature*, 364(6434), pp.259–62.
- Huie, R.E. & Padmaja, S., 1993. *The reaction of NO with superoxide. Free radical research communications*, 18(4), pp.195–9.
- Inanami, O. et al., 1998. *Oral administration of (-)-catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. Free radical research*, 29(4), pp.359–65.
- Ishii, T. et al., 2000. *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. The Journal of biological chemistry*, 275(21), pp.16023–9.
- Ishii, T., Itoh, K. & Yamamoto, M., 2002. *Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. Methods in enzymology*, 348, pp.182–90.
- Itoh, K. et al., 1997. *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochemical and biophysical research communications*, 236(2), pp.313–22.
- Itoh, K. et al., 1999. *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes & development*, 13(1), pp.76–86.
- Itoh, K., Tong, K.I. & Yamamoto, M., 2004. *Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. Free radical biology & medicine*, 36(10), pp.1208–13.
- Jacobs, S. et al., 2007. *Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. The Cochrane database of systematic reviews*, (4), p.CD003311.
- Jain, A.K. & Jaiswal, A.K., 2006. *Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. The Journal of biological chemistry*, 281(17), pp.12132–42.
- Jaiswal, A.K., 2004. *Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. Free radical biology & medicine*, 36(10), pp.1199–207.
- James, A. & Cherian, S., 2010. *Pathophysiology of perinatal hypoxia–ischaemia. Paediatrics and Child Health*, 20(8), pp.351–355.
- Jean, J.C., Rich, C.B. & Joyce-Brady, M., 2006. *Hypoxia results in an HIF-1-dependent induction of brain-specific aldolase C in lung epithelial cells. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 291(5), pp.L950–6.
- Jeon, H. et al., 2007. *Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. Molecular pharmacology*, 71(6), pp.1676–84.
- Jeong, J.W. et al., 2002. *Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. Cell*, 111(5), pp.709–20.
- Johnston, M. V et al., 2001. *Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. Pediatric research*, 49(6), pp.735–41.
- Joseph, J.A. et al., 1998. *Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(19), pp.8047–55.
- Joseph, J.A. et al., 1999. *Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary*

- supplementation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(18), pp.8114–21.
- Jung, Y.W., Choi, I.J. & Kwon, T.H., 2007. Altered expression of sodium transporters in ischemic penumbra after focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience research*, 59(2), pp.152–9.
- Juurlink, B.H. & Paterson, P.G., 1998. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *The journal of spinal cord medicine*, 21(4), pp.309–34.
- Kahle, K., Kraus, M. & Richling, E., 2005. Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular nutrition & food research*, 49(8), pp.797–806.
- Kalimo, H. et al., 1981. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(3), pp.313–27.
- Kallio, P.J. et al., 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *The EMBO journal*, 17(22), pp.6573–86.
- Kang, M.I. et al., 2004. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp.2046–51.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. & Biswal, S., 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp.89–116.
- Kim, H.J. et al., 2010. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), pp.8643–50.
- Kim, J. et al., 2012. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochemistry international*, 60(5), pp.466–74.
- Kimelberg, H.K. et al., 1990. Brain anti-cyotoxic edema agents. *Progress in clinical and biological research*, 361, pp.363–85.
- Klaassen, C.D. & Slitt, A.L., 2005. Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. *Current drug metabolism*, 6(4), pp.309–28.
- Kobayashi, A. et al., 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology*, 24(16), pp.7130–9.
- Kobayashi, M. & Yamamoto, M., 2005. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 7(3-4), pp.385–94.
- Kobayashi, M. & Yamamoto, M., 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in enzyme regulation*, 46, pp.113–40.
- Koivisto, A. et al., 1997. Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS letters*, 417(1), pp.75–80.
- Kraft, A.D., Johnson, D.A. & Johnson, J.A., 2004. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(5), pp.1101–12.
- Kris-Etherton, P.M. et al., 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual review of nutrition*, 24, pp.511–38.
- Kuramitsu, Y. et al., 2010. Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer research*, 30(9), pp.3367–72.
- Kurinczuk, J.J., White-Koning, M. & Badawi, N., 2010. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early human development*, 86(6), pp.329–38.
- Kwak, J.Y. et al., 1991. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochimica et biophysica acta*, 1076(3), pp.369–73.

- Kwak, M.-K. et al., 2002. *Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. Molecular and cellular biology*, 22(9), pp.2883–92.
- Lai, M.C. & Yang, S.N., 2011. *Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.609813.
- Lando, D. et al., 2002. *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), pp.858–61.
- LaPres, J.J. et al., 2000. *ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. The Journal of biological chemistry*, 275(9), pp.6153–9..
- Lau, A. et al., 2008. *Dual roles of Nrf2 in cancer. Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 58(5-6), pp.262–70.
- Le, W.D., Xie, W.J. & Appel, S.H., 1999. *Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. Journal of neuroscience research*, 56(6), pp.652–8.
- Lee, E.J., Ji, G.E. & Sung, M.K., 2010. *Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells. Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, 59(10), pp.847–54.
- Lee, J.M. et al., 2003. *NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. The Journal of biological chemistry*, 278(39), pp.37948–56.
- Lee, J.M., Zipfel, G.J. & Choi, D.W., 1999. *The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature*, 399(6738 Suppl), pp.A7–14.
- Lee, K., Roth, R. & LaPres, J.J., 2007. *Hypoxia, drug therapy and toxicity. Pharmacology & therapeutics*, 113(2), pp.229–46.
- Lee, K.W. et al., 2008. *Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. Cancer research*, 68(3), pp.946–55.
- Legido, A. et al., 2007. *Neuroprotection in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Effective treatment and future perspectives. Medicina*, 67(6 Pt 1), pp.543–55.
- Leonard, M.O. et al., 2006. *Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(14), pp.2624–6.
- Leonardo, C.C. & Doré, S., 2011. *Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins. Nutritional neuroscience*, 14(5), pp.226–36.
- Li, J., Lee, J.M. & Johnson, J.A., 2002. *Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. The Journal of biological chemistry*, 277(1), pp.388–94.
- Liberatori, S. et al., 2004. *Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. Proteomics*, 4(5), pp.1335–40.
- Lin, H.C. et al., 2004. *Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by quercetin in rat aortic smooth muscle cells. Pharmacology*, 71(2), pp.107–12.
- Little, W.J. 1966. *On the influence of abnormal parturition, difficult labours, premature birth, and asphyxia neonatorum, on the mental and physical condition of the child, especially in relation to deformities. Clinical orthopaedics and related research*, 46, pp.7–22.
- Liu, H. et al., 2004. *Peripheral oxidative biomarkers constitute a valuable indicator of the severity of oxidative brain damage in acute cerebral infarction. Brain research*, 1025(1-2), pp.43–50.
- Lowry, O.H. et al., 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–75.
- Ma, L. et al., 2010. *Genome-wide microarray analysis of the differential neuroprotective effects of antioxidants in neuroblastoma cells overexpressing the familial Parkinson's disease alpha-synuclein A53T mutation. Neurochemical research*, 35(1), pp.130–42.
- Mahon, P.C., Hirota, K. & Semenza, G.L., 2001. *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-*

- 1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. Genes & development, 15(20), pp.2675–86.*
- Manach, C. et al., 2004. *Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition, 79(5), pp.727–47.*
- Mandel, S.A. et al., 2008. *Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. CNS neuroscience & therapeutics, 14(4), pp.352–65.*
- Martin, L.J. et al., 1997. *Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. The Journal of comparative neurology, 377(2), pp.262–85.*
- Martínez, C. et al., 2005. *Neuroprotección mediante hipotermia moderada en recién nacidos con encefalopatía hipóxico-isquémica. Archivos de Pediatría del Uruguay, 82(3), pp.159–170.*
- Martínez-Biarge, M. et al., 2010. *Outcomes after central grey matter injury in term perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. Early human development, 86(11), pp.675–82.*
- Masaki, M. et al., 2003. *Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically. European journal of biochemistry / FEBS, 270(1), pp.76–83.*
- Matsushima, M. et al., 2009. *Heme oxygenase-1 mediates the anti-allergic actions of quercetin in rodent mast cells. Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society, 58(10), pp.705–15.*
- Matter, W.F., Brown, R.F. & Vlahos, C.J., 1992. *The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. Biochemical and biophysical research communications, 186(2), pp.624–31.*
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S. & Johnston, M. V, 1988. *Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. Brain research, 459(1), pp.200–3.*
- McEwen, B.S., 1998. *Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. Annals of the New York Academy of Sciences, 840(1), pp.33–44.*
- McGee, A.M. et al., 2011. *The mitochondrial protein C1qbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 10(23), pp.4119–27.*
- McGee, A.M. & Baines, C.P., 2011. *Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death. The Biochemical journal, 433(1), pp.119–25.*
- McMahon, M. et al., 2001. *The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. Cancer research, 61(8), pp.3299–307.*
- McQuillen, P.S. & Ferriero, D.M., 2004. *Selective vulnerability in the developing central nervous system. Pediatric neurology, 30(4), pp.227–35.*
- Metzen, E. et al., 2003. *Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. Molecular biology of the cell, 14(8), pp.3470–81.*
- Meyers, K.J., Rudolf, J.L. & Mitchell, A.E., 2008. *Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. Journal of agricultural and food chemistry, 56(3), pp.830–6.*
- Miao, W. et al., 2005. *Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. The Journal of biological chemistry, 280(21), pp.20340–8.*
- Mingone, C.J. et al., 2006. *Protoporphyrin IX generation from delta-aminolevulinic acid elicits pulmonary artery relaxation and soluble guanylate cyclase activation. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 291(3), pp.L337–44.*
- Mizrahi, A. et al., 2009. *Plant foods and the risk of cerebrovascular diseases: a potential protection of fruit consumption. The British journal of nutrition, 102(7), pp.1075–83.*
- Moi, P. et al., 1994. *Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(21), pp.9926–30.*

- Morand, C. et al., 2000. *Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model*. *BioFactors (Oxford, England)*, 12(1-4), pp.169–74.
- Motohashi, H. & Yamamoto, M., 2004. *Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism*. *Trends in molecular medicine*, 10(11), pp.549–57.
- Motterlini, R. et al., 2000. *Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols*. *The Journal of biological chemistry*, 275(18), pp.13613–20.
- Motterlini, R., Green, C.J. & Foresti, R., 2002. *Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide*. *Antioxidants & redox signaling*, 4(4), pp.615–24.
- Motterlini, R. & Otterbein, L.E., 2010. *The therapeutic potential of carbon monoxide*. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(9), pp.728–43.
- Muraguchi, T., Kawawa, A. & Kubota, S., 2010. *Prohibitin protects against hypoxia-induced H9c2 cardiomyocyte cell death*. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, 31(2), pp.113–22.
- Murphy, T.H., De Long, M.J. & Coyle, J.T., 1991. *Enhanced NAD(P)H:quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress*. *Journal of neurochemistry*, 56(3), pp.990–5.
- Mursu, J. et al., 2008. *Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study*. *The British journal of nutrition*, 100(4), pp.890–5.
- Myhrstad, M.C.W. et al., 2002. *Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter*. *Free radical biology & medicine*, 32(5), pp.386–93.
- Nakamura, T. et al., 2011. *Attenuation of transforming growth factor- β -stimulated collagen production in fibroblasts by quercetin-induced heme oxygenase-1*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 44(5), pp.614–20.
- Natarajan, R. et al., 2005. *Hypoxia inducible factor-1: regulation by nitric oxide in posthypoxic microvascular endothelium*. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 83(5), pp.597–607.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.C., et al., 2003b. *Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome*. *The Journal of biological chemistry*, 278(7), pp.4536–41.
- Nguyen, T. et al., 2005. *Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1*. *The Journal of biological chemistry*, 280(37), pp.32485–92.
- Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C.B., 2009. *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. *The Journal of biological chemistry*, 284(20), pp.13291–5.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J. & Pickett, C.B., 2003a. *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43, pp.233–60.
- Nguyen, T., Yang, C.S. & Pickett, C.B., 2004. *The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress*. *Free radical biology & medicine*, 37(4), pp.433–41.
- Niatetskaya, Z. V et al., 2012. *The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice*. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(9), pp.3235–44.
- Nicholson, S.K., Tucker, G.A. & Brameld, J.M., 2008. *Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells*. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(1), pp.42–7.
- Nicholls, D. & Attwell, D., 1990. *The release and uptake of excitatory amino acids*. *Trends in pharmacological sciences*, 11(11), pp.462–8.
- Nicholls, D.G., 2004. *Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures*. *Current molecular medicine*, 4(2), pp.149–77.

- Nijveldt, R.J. et al., 2001. *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American journal of clinical nutrition*, 74(4), pp.418–25.
- Nonn, L., Berggren, M. & Powis, G., 2003. *Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. Molecular cancer research : MCR*, 1(9), pp.682–9.
- Nozar F., Fiol V., Briozzo L., 2005. *Análisis de la prevalencia de sufrimiento fetal agudo y síndrome hipóxico-isquémico en la maternidad del Centro Hospitalario Pereira Rossell. Arch Gin Obstet*, 43(1): 45-9.
- Ockaili, R. et al., 2005. *HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(2), pp.H542–8.
- Ossola, B., Kääriäinen, T.M. & Männistö, P.T., 2009. *The multiple faces of quercetin in neuroprotection. Expert opinion on drug safety*, 8(4), pp.397–409.
- Ostergaard, L. et al., 2009. *Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmatic stress proteins in human endothelial cells. Proteomics*, 9(19), pp.4457–67.
- Otterbein, L.E. & Choi, A.M., 2000. *Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 279(6), pp.L1029–37.
- Padmanabhan, B. et al., 2006. *Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. Molecular cell*, 21(5), pp.689–700.
- Pan, Y. et al., 2007. *Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. Molecular and cellular biology*, 27(3), pp.912–25.
- Pantazis, N.J. et al., 2000. *Transfection of C6 glioma cells with glia maturation factor upregulates brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor: trophic effects and protection against ethanol toxicity in cerebellar granule cells. Brain research*, 865(1), pp.59–76.
- Park, S.-S., Bae, I. & Lee, Y.J., 2008. *Flavonoids-induced accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α /2 α is mediated through chelation of iron. Journal of cellular biochemistry*, 103(6), pp.1989–98.
- Petrushanko, I.Y. et al., 2007. *Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. The Journal of general physiology*, 130(4), pp.389–98.
- Pfaffl, M.W., 2001. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. , 29(9)*, pp.16–21.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L., 2002. *Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. , 30(9)*.
- Piret, J.P. et al., 2002. *Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? Biochemical pharmacology*, 64(5-6), pp.889–92.
- Polotsky, V.Y. et al., 2010. *Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells. Physiological genomics*, 41(3), pp.306–14.
- Pollard, S.E. et al., 2006. *The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. Biochemical and biophysical research communications*, 350(4), pp.960–8.
- Poon, H.F. et al., 2004. *Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 59(5), pp.478–93.
- Portera-Cailliau, C., Price, D.L. & Martin, L.J., 1997. *Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. The Journal of comparative neurology*, 378(1), pp.88–104.
- Quideau, S. et al., 2011. *Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(3), pp.586–621.
- Ramsey, C.P. et al., 2007. *Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. Journal of neuropathology and experimental neurology*, 66(1), pp.75–85.
- Rees, S., Harding, R. & Walker, D., 2011. *The biological basis of injury and neuroprotection in the*

- fetal and neonatal brain. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 29(6), pp.551–63.
- Richard, D.E. et al., 1999. *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. The Journal of biological chemistry*, 274(46), pp.32631–7.
- Ritz, M.F. et al., 2008. *Chronic treatment with red wine polyphenol compounds mediates neuroprotection in a rat model of ischemic cerebral stroke. The Journal of nutrition*, 138(3), pp.519–25.
- Rivera, F. et al., 2004. *Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure-activity relationship. Neurotoxicity research*, 6(7-8), pp.543–53.
- Robertson, C.M., Finer, N.N. & Grace, M.G., 1989. *School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. The Journal of pediatrics*, 114(5), pp.753–60.
- Romero Esquiliano, G. et al., 2004. *Daño neurológico secundario a hipoxia isquemia perinatal. Archivos de neurociencias (México, D.F.)*, 9(3), pp.143–150.
- Rosenberger, C., Rosen, S. & Heyman, S.N., 2005. *Current understanding of HIF in renal disease. Kidney & blood pressure research*, 28(5-6), pp.325–40.
- Rushmore, T.H. & Kong, A.-N.T., 2002. *Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. Current drug metabolism*, 3(5), pp.481–90.
- Russo, M. et al., 1999. *Quercetin and anti-CD95(Fas/Apo1) enhance apoptosis in HPB-ALL cell line. FEBS letters*, 462(3), pp.322–8.
- Ryter, S.W. et al., 2002. *Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. Molecular and cellular biochemistry*, 234-235(1-2), pp.249–63.
- Ryter, S.W., Alam, J. & Choi, A.M.K., 2006. *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. Physiological reviews*, 86(2), pp.583–650.
- Sang, N. et al., 2002. *Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. Molecular and cellular biology*, 22(9), pp.2984–92.
- Sang, N. et al., 2003. *MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. The Journal of biological chemistry*, 278(16), pp.14013–9.
- Sano, K., Nakamura, H. & Matsuo, T., 1985. *Mode of inhibitory action of bilirubin on protein kinase C. Pediatric research*, 19(6), pp.587–90.
- Scambia, G. et al., 1990. *Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. British journal of cancer*, 62(6), pp.942–6.
- Schafer, Z.T. et al., 2006. *Enhanced sensitivity to cytochrome c-induced apoptosis mediated by PHAPI in breast cancer cells. Cancer research*, 66(4), pp.2210–8.
- Schültke, E. et al., 2010. *Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: correlation of treatment duration with recovery of motor function. Spinal cord*, 48(2), pp.112–7.
- Schulzke, S.M., Rao, S. & Patole, S.K., 2007. *A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy - are we there yet? BMC pediatrics*, 7, p.30.
- Sedlak, T.W. & Snyder, S.H., 2004. *Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. Pediatrics*, 113(6), pp.1776–82.
- Semenza, G., 2002. *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. Biochemical pharmacology*, 64(5-6), pp.993–8.
- Semenza, G.L., 2004. *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. Physiology (Bethesda, Md.)*, 19, pp.176–82.
- Semenza, G.L. et al., 1996. *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. The Journal of biological chemistry*, 271(51), pp.32529–37.
- Semenza, G.L., 1998. *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. Current opinion in genetics & development*, 8(5), pp.588–94.

- Semenza, G.L., 2003. *Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature reviews. Cancer*, 3(10), pp.721–32.
- Serafini, M., Peluso, I. & Raguzzini, A., 2010. *Flavonoids as anti-inflammatory agents. The Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), pp.273–8.
- Sethy, N.K. et al., 2011. *Upregulation of transcription factor NRF2-mediated oxidative stress response pathway in rat brain under short-term chronic hypobaric hypoxia. Functional & integrative genomics*, 11(1), pp.119–37.
- Shah, Z.A. et al., 2007. *Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury. Neuroscience*, 147(1), pp.53–9.
- Shankaran, S., 2009. *Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia. Journal of neurotrauma*, 26(3), pp.437–43.
- Sharp, F.R. & Bernaudin, M., 2004. *HIF1 and oxygen sensing in the brain. Nature reviews. Neuroscience*, 5(6), pp.437–48.
- Shih, A.Y. et al., 2003a. *Coordinate Regulation of Glutathione Biosynthesis and Release by Nrf2-Expressing Glia Potently Protects Neurons from Oxidative Stress.* , 23(8), pp.3394–3406.
- Shih, A.Y. et al., 2003b. *Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp.3394–406.
- Shih, A.Y., Li, P. & Murphy, T.H., 2005. *A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(44), pp.10321–35.
- Shinkai, T. et al., 2005. *The role of oxygen tension in the regulation of embryonic lung development. Journal of pediatric surgery*, 40(1), pp.32–5.
- Siddappa, A.J.M. et al., 2002. *Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain. Journal of neuroscience research*, 68(6), pp.761–75.
- Siesjö, B.K., 1992. *Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. Journal of neurosurgery*, 77(3), pp.337–54.
- Simonian, N.A. & Coyle, J.T., 1996. *Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annual review of pharmacology and toxicology*, 36, pp.83–106.
- Simonyi, A. et al., 2005. *Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. Molecular neurobiology*, 31(1-3), pp.135–47.
- Slebos, D.-J., Ryter, S.W. & Choi, A.M.K., 2003. *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. Respiratory research*, 4, p.7.
- Sonna, L.A. et al., 2003. *Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). Physiological genomics*, 12(3), pp.195–207.
- Spencer, J.P.E., 2009a. *Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. Genes & nutrition*, 4(4), pp.243–50.
- Spencer, J.P.E., 2008. *Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), pp.238–52.
- Spencer, J.P.E., 2009b. *The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. Chemical Society reviews*, 38(4), pp.1152–61.
- Stewart, D. et al., 2003. *Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. The Journal of biological chemistry*, 278(4), pp.2396–402.
- Stocker, R. et al., 1987. *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science (New York, N.Y.)*, 235(4792), pp.1043–6.
- Stolze, I.P. et al., 2004. *Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes. The Journal of biological chemistry*, 279(41), pp.42719–25.
- Sugawara, T. & Chan, P.H., 2003. *Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. Antioxidants & redox signaling*, 5(5), pp.597–607.
- Sun, J. et al., 2002. *Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. The EMBO journal*, 21(19), pp.5216–24. A

- Sun, Z. et al., 2011. *KPNA6 (Importin α 7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. Molecular and cellular biology*, 31(9), pp.1800–11.
- Takizawa, S. et al., 2003. *Quercetin, a natural flavonoid, attenuates vacuolar formation in the optic tract in rat chronic cerebral hypoperfusion model. Brain research*, 980(1), pp.156–60.
- Tal, R., 2012. *The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha in preeclampsia pathogenesis. Biology of reproduction*, 87(6), p.134.
- Talalay, P., 2000. *Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. BioFactors (Oxford, England)*, 12(1-4), pp.5–11.
- Talalay, P. et al., 1995. *Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. Toxicology letters*, 82-83, pp.173–9..
- Thimmulappa, R.K. et al., 2002. *Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. Cancer research*, 62(18), pp.5196–203.
- Thoresen, M. et al., 1995. *Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. Pediatric research*, 37(5), pp.667–70.
- Triantafyllou, A. et al., 2007. *The flavonoid quercetin induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits cell proliferation by depleting intracellular iron. Free radical research*, 41(3), pp.342–56.
- Turner, C.P., Panter, S.S. & Sharp, F.R., 1999. *Anti-oxidants prevent focal rat brain injury as assessed by induction of heat shock proteins (HSP70, HO-1/HSP32, HSP47) following subarachnoid injections of lysed blood. Brain research. Molecular brain research*, 65(1), pp.87–102.
- Ushmorov, A. et al., 1999. *Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. Blood*, 93(7), pp.2342–52.
- Van Elzen, R., Moens, L., & Dewilde, S. (2008). *Expression profiling of the cerebral ischemic and hypoxic response. Expert Review of Proteomics*, 5(2), 263–82.
- Vannucci, S.J. & Hagberg, H., 2004. *Hypoxia-ischemia in the immature brain. The Journal of experimental biology*, 207(Pt 18), pp.3149–54.
- Vargas, A.J. & Burd, R., 2010. *Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutrition reviews*, 68(7), pp.418–28.
- Vargas, M.R. et al., 2008. *Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(50), pp.13574–81.
- Vauzour, D. et al., 2008. *The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. Genes & nutrition*, 3(3-4), pp.115–26.
- Vengellur, A. et al., 2005. *Gene expression profiling of hypoxia signaling in human hepatocellular carcinoma cells. Physiological genomics*, 22(3), pp.308–18.
- Vengellur, A. et al., 2003. *Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts. Gene expression*, 11(3-4), pp.181–97.
- Vijayababu, M.R. et al., 2005. *Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. Journal of cancer research and clinical oncology*, 131(11), pp.765–71.
- Vinacur, J. et al., 2000. *Hipoxia-asfixia: analisis epidemiologico. Argentina 1992-1995. Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*, 19(3), pp.113–119.
- Vogler, M. et al., 2013. *Hypoxia modulates fibroblastic architecture, adhesion and migration: a role for HIF-1 α in cofilin regulation and cytoplasmic actin distribution. PloS one*, 8(7), p.e69128.
- Volpe J.J., 1995. *Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis. In: Neurology of the newborn. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders*, pp 291–313.
- Volpe, J.J., 2001. *Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 7(1), pp.56–64.
- Volpe, J.J., 2005. *Encefalopatía hipóxico isquémica. Neurología del Recién Nacido. 4 ed.*

- Philadelphia: Saunders, 289-341.
- Wang, B. et al., 2011. *Carbon monoxide-activated Nrf2 pathway leads to protection against permanent focal cerebral ischemia*. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 42(9), pp.2605–10.
- Wang, G.L. et al., 1995. *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), pp.5510–4.
- Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y. & Lin, J.K., 1999. *Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells*. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 35(10), pp.1517–25.
- Wang, X.Q. et al., 2011. *Quercetin protects oligodendrocyte precursor cells from oxygen/glucose deprivation injury in vitro via the activation of the PI3K/Akt signaling pathway*. *Brain research bulletin*, 86(3-4), pp.277–84.
- Wang, Z. et al., 2007. *Large scale analysis of genes contributing to the herbal preparation dependent hippocampal plasticity in postischemic rehabilitation*. *Vascular pharmacology*, 47(5-6), pp.319–27.
- Weinreb, O., Mandel, S. & Youdim, M.B.H., 2003a. *cDNA gene expression profile homology of antioxidants and their antiapoptotic and proapoptotic activities in human neuroblastoma cells*. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(8), pp.935–7.
- Weinreb, O., Mandel, S. & Youdim, M.B.H., 2003b. *Gene and protein expression profiles of anti- and pro-apoptotic actions of dopamine, R-apomorphine, green tea polyphenol (-)-epigallocatechine-3-gallate, and melatonin*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 993, pp.351–61; discussion 387–93.
- Weng, C.J. et al., 2011. *Hepatoprotection of quercetin against oxidative stress by induction of metallothionein expression through activating MAPK and PI3K pathways and enhancing Nrf2 DNA-binding activity*. *New biotechnology*, 28(6), pp.767–77.
- White, B.C. et al., 2000. *Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury*. *Journal of the neurological sciences*, 179(S 1-2), pp.1–33.
- Wilson, W.J. & Poellinger, L., 2002. *The dietary flavonoid quercetin modulates HIF-1 alpha activity in endothelial cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), pp.446–50.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E. & Rice-Evans, C., 2004. *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free radical biology & medicine*, 36(7), pp.838–49.
- Yamaji, R. et al., 2004. *Hypoxic up-regulation of triosephosphate isomerase expression in mouse brain capillary endothelial cells*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 423(2), pp.332–42.
- Yang, C. et al., 2009. *Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia*. *Brain research*, 1282, pp.133–41.
- Yin, Z. et al., 2000. *Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases*. *Cancer research*, 60(15), pp.4053–7.
- Yoshida, M. et al., 1990. *The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells*. *FEBS letters*, 260(1), pp.10–3.
- Zeynalov, E. & Doré, S., 2009. *Low doses of carbon monoxide protect against experimental focal brain ischemia*. *Neurotoxicity research*, 15(2), pp.133–7.
- Zhang, D.D. et al., 2004. *Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex*. *Molecular and cellular biology*, 24(24), pp.10941–53.
- Zhang, D.D., 2006. *Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway*. *Drug metabolism reviews*, 38(4), pp.769–89.
- Zhang, Z. et al., 2005. *Gene expression profile induced by oral administration of baicalin and gardenin after focal brain ischemia in rats*. *Acta pharmacologica Sinica*, 26(3), pp.307–14.
- Zheng, Y. et al., 2011. *Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement*. *Cell*, 1, pp.1–6.
- Zhou, G. et al., 2008. *Hypoxia-mediated Na-K-ATPase degradation requires von Hippel Lindau*



protein. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 22(5), pp.1335–42.

Anexo: Protocolos y Soluciones

Protocolo de Extracción de ARN total con el Kit comercial ilustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit

1. Homogeneizar con homogeneizador a pilas hasta 30 mg de tejido en 350 μ L de buffer de lisis RA1 + 3.5 μ L de β -mercaptoetanol. Pasar por una jeringa (20G) 10 veces.
2. El lisado se debe filtrar a través de la columna de filtración, por centrifugación a 11000g por 1 min.
3. El filtrado transferido a un nuevo tubo recibe 350 μ L de etanol 70% y mezclar con vórtex dos veces por 5 segundos. En este paso se puede formar un precipitado, se debe cargar todo el precipitado en el próximo paso.
4. Pasar el lisado a la columna de purificación del kit. Centrifugar a 8000g por 30 segundos.
5. Añadir 350 μ L de Buffer de "desalado-desalting" MDB. Centrifugar a 11000g por 1 minuto. Descartar el filtrado.
6. Añadir directamente sobre el centro de la columna 95 μ L mezcla de reacción de DNAsa I (preparada con 10 μ L de DNAsa I reconstituida a 90 μ L de Buffer de Reacción de DNAsa)
7. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Para un primer lavado y desactivar la DNAsa I: añadir 200 μ L de Buffer de lavado I (RA2) a la columna y centrifugar a 11000g por 1 minuto. Descartar el filtrado.
9. Añadir 600 μ L de buffer de lavado II (RA3) a la columna. Centrifugar a 11000g por 1 minuto. Descartar el filtrado.
10. Añadir 250 μ L de buffer de lavado II (RA3) a la columna. Centrifugar a 11000g por 2 minutos. Descartar el filtrado.
11. Pasar la columna a un tubo eppendorf de 1,5 libre de nucleasa.
12. Eluir el ARN en H₂O libre de RNAsas centrifugando a 11000g por 1 minuto. Nosotros eluimos en 40 μ L y realizamos una segunda elución en 20 μ L

Protocolo de Retrotranscripción

1. En un tubo de microcentrífuga estéril agregar: 2 μg de ARN, 1 μL de oligodT primers (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL de Random Primers (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 1 μL de mezcla de dNTPs (10 mM), H₂O nuclease-free hasta un volumen final de 13.5 μL
2. Calentar 5 minutos a 65°C. Centrifugar brevemente y colocar rápidamente en hielo.
3. Añadir: 2 μL de Buffer RT 10X (500 mM Tris-HCl pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 0.5 μL de Inhibidor de RNAsas (RiboLock RNase Inhibitor de Fermentas Life Sciences 40 U/ μL), y 1 μL de M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μL). Volumen final 20 μL .
4. Incubar a 25°C por 10 minutos.
5. Incubar a 42°C por 60 minutos
6. Incubar a 90°C por 10 minutos para inactivar la enzima.
7. Los cDNAs obtenidos se congelan a -20°C hasta su utilización.

Protocolo Electroforesis en agarosa

1. Pesar 0.3g de agarosa y añadir 30 ml de TBE 1X
2. Calentar hasta lograr la disolución completa de la agarosa.
3. Agregar 1.5 μ l de Gel Red Nucleic Acid Gel Stain de Biotium
4. Dejar enfriar levemente y verter en la bandeja de la cuba donde se va a correr el gel. Esperar algunos minutos hasta que gelifique.
5. Preparar las muestras para correr: 1 μ l de ARN, 8 μ l de H₂O miliQ, 1 μ l de Buffer de Carga 10X. 9 μ l de amplicón + 1 μ l de Buffer de Carga 10X
6. Colocar la bandeja con el gel en la cuba. Llenar la cuba con TBE 1X. Cargar en los pocillos las muestras y 7 μ l de marcador de peso molecular Fast Ruler DNA ladder low range de Fermentas Life Sciences.
7. Correr durante 20 min a 80V.
8. Proceder a la visualización del gel en un transiluminador.

Protocolo Electroforesis en poliacrilamida

1. Preparar el gel de poliacrilamida como se indica en la tabla X. Verter en los vidrios previamente ensamblados. Esperar entre 15 y 30 minutos hasta que gelifique.
2. Preparar las muestras para correr: 5 μ l de muestra, 1.5 μ l de Buffer de carga (95% formamida, 20mM EDTA, 0.05% Azul de Bromofenol, 0.05% Xylene Cyanol FF).
3. Preparar el marcador de peso molecular: 1 μ l peso molecular Fast Ruler DNA ladder low range de Fermentas Life Sciences, 4 μ l de H₂O miliQ, y 1,5 μ l de Buffer de carga.
4. Armar la cuba con el gel dentro. Llenar la cuba con TBE 1X.
5. Cargar las muestras en los pocillos.
6. Correr los geles 30 minutos a 90V.
7. Teñirlos con nitrato de plata:
 - a) Sumergir en Solución de Fijador (13.3% etanol, 0.5% ácido acético) por 10 minutos con agitación suave
 - b) Sumergir en Solución de Tinción (0.002g/ml AgNO₃) por 10 minutos con agitación suave.
 - c) Enjuagar con agua destilada dos veces rápidamente
 - d) Sumergir en Solución de Revelado (0.03g/ml NaOH, 0.5% formaldehido).

Gel poliacrilamida 6% (8 ml)

Reactivo	Volumen
H ₂ O	4,8 ml
TBE 5X	1,6 ml
Acrilamida 30%	1,6 ml
APS	80 μ l
TEMED	8 μ l

Protocolo de purificación de ADN a partir de agarosa con kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

1. Recortar la banda del gel (máximo 300mg). Cortarla en trozos y transferir a un eppendorf.
2. Pesar un eppendorf vacío y pesar el eppendorf con la banda recortada para calcular el peso de la porción de gel recortada.
3. Agregar Capture Buffer (10 μ l por cada 10mg de gel).
4. Vortexear vigorosamente. Incubar a 60°C hasta que la agarosa se disuelva.
5. Centrifugar brevemente.
6. Poner una columna del kit en el tubo colector y transferir la muestra a la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
7. Centrifugar a velocidad máxima por 30 segundos. Descartar el eluido del tubo colector.
8. Agregar 500 μ l de buffer de lavado.
9. Centrifugar 30 segundos a velocidad máxima. Poner la columna en un nuevo eppendorf.
10. Agregar 50 μ l de agua para eluir.
11. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.

Protocolo 1 Extracción Proteica

El protocolo consiste en homogeneizar aproximadamente 50 mg de tejido en Urea Cracking Buffer (10mM), PMSF (1mM), β -mercaptoetanol (1%) + cocktail inhibidor de proteasas de Sigma Aldrich # catálogo P2714 (1%) con homogeneizador a pila (aproximadamente 200 μ l). Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuga 20 minutos a velocidad máxima a temperatura ambiente. El sobrenadante, es transferido a un nuevo tubo eppendorf cuidando de no traspasar pellet si los hubiese. Las proteínas extraídas se almacenan a -20°C hasta su utilización.

Urea Cracking Buffer (50ml)

Reactivo	Stock	Concentración final	Cantidad
Na_2HPO_4	PM=142 g/mol	10mM	0.071 g
SDS	10%	1%	5 ml
UREA	PM=60,06	5 mM	15,015g

Agregar al momento de usar: PMSF 100mM (final 1 mM) y β -mercaptoetanol 100% (1% final), cocktail inhibidor de proteasas (1% final). El UCB es almacenado a temperatura ambiente.

Protocolo de limpieza de muestras proteicas con kit GE Healthcare 2D Clean Up Kit

1. Transferir 100 μ L de proteína a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Añadir 300 μ L de precipitante y mezclar bien por vórtex.
3. Incubar en hielo por 15 minutos.
4. Añadir 300 μ L de co-precipitante a la mezcla de proteína y precipitante. Mezclar con vórtex brevemente.
5. Centrifugar a máxima velocidad (por lo menos 12000g por 5 minutos. Remover los tubos de la centrifuga apenas termine. Debe verse un pellet. Proceder rápido al paso siguiente.
6. Remover el sobrenadante sin tocar el pellet.
7. Centrifugar de nuevo, dar un pulso breve. Remover el sobrenadante. En este paso no debe quedar nada de líquido.
8. Sin perturbar el pellet, colocar 10 μ L del co-precipitante arriba del pellet. Dejar en hielo por 5 minutos.
9. Centrifugar por 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
10. Colocar 25 μ L de agua destilada encima del pellet. Vortexear por 5-10 segundos. El pellet debe quedar disperso, pero no disuelto en agua.
11. Agregar 1 mL de buffer de lavado (previamente enfriado por lo menos 1 hora a -20°C) y agregar 5 μ L de aditivo de lavado. Vortexear hasta que el pellet esté bien disperso, no disuelto.
12. Incubar a -20°C por 30 minutos. Vortexear por 20-30 segundos 1 vez cada 10 minutos.
13. Centrifugar a velocidad máxima (por lo menos 12000g) por 5 minutos.
14. Remover el sobrenadante. Debe verse un pellet blanco. Dejar secar al aire brevemente (no más de 5 minutos).
15. Resuspender el pellet en un volumen apropiado (100 μ L) de buffer de lisis (40 mM Tris base, 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 1mM PMSF, 1% cocktail inhibidor de proteasas).
16. Conservar la muestra a -20°C hasta su utilización.

Fraccionamiento proteico: Protocolo 1

1. Se homogeniza manualmente en hielo el tejido en 2 volúmenes de tejido del buffer A con homogeneizador de vidrio (4 veces).
2. Se centrifuga a 3000 rpm por 5 min a 4°C
3. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 4 volúmenes de pellet de buffer de lisis NP- 40.
4. Se incuba en hielo por 15 min.
5. Se homogeniza manualmente el pellet en hielo (30 veces).
6. Se centrifuga por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C.
7. Se colecta el sobrenadante. Esa es la fracción citoplasmática.
8. El pellet se resuspende en 2 volúmenes de pellet de buffer B.
9. Se incuba en hielo por 15 min.
10. Se centrifuga 30 minutos a 10000 rpm a 4°C. El Sobrenadante es la fracción nuclear.

Preparación de soluciones

Buffer A (10 ml): 10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, y 1:1000 cocktail de inhibidores de proteasas.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Hepes 1M pH 7,9	100 µl	10 mM
MgCl ₂ 1M	15 µl	1,5 mM
KCl 1M	100 µl	10 mM
DTT 0,1M	50 µl	0,5 mM
PMSF	10 µl	1:1000

Buffer de lisis NP-40 (10 ml): 0.1% NP-40, 10 mM Tris [pH 8.0], 10 mM MgCl₂, 15 mM NaCl con 1:1000 cocktail de inhibidores de proteasas.

Reactivo	Volumen	Concentración final
NP-40 (100%)	10 µl	0,1%
Tris pH 8,0 1M	100 µl	10 mM
MgCl ₂ 1M	100 µl	10 mM
NaCl 5M	30 µl	15 mM
PMSF	10 µl	1:1000

Buffer B (10 ml): 20 mM Hepes pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 25% glycerol, y 1:1000 cocktail de inhibidores de proteasas.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Hepes 1M pH 7,9	200 µl	20 mM
NaCl 5M	840 µl	420 mM
EDTA 0,4M	5 µl	0,2 mM
DTT 0,1 M	50 µl	0,5 mM
MgCl ₂	15 µl	1,5 mM
Glycerol 100%	2,5 ml	25%
PMSF	10 µl	1:1000

Protocolo extraído de (Ramsey et al. 2007).

Fraccionamiento proteico: Protocolo 2 con kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents

Notas:

- Inmediatamente antes de empezar se debe añadir inhibidores de proteasas a CER I y NER (no es necesario añadir inhibidor de proteasas a CER II).
- Todas las centrifugaciones se deben hacer a 4°C, y se deben mantener todas las muestras y extractos en hielo.
- Preenfriar todos los tubos y soluciones que se van a utilizar.

Procedimiento:

1. Cortar de 20-100mg de tejido en pequeños pedazos y colocarlos en un tubo de microcentrífuga.
2. Lavar el tejido con PBS. Centrifugar el tejido a 500g por 5 minutos. El uso de PBS se puede omitir.
3. Usar una pipeta para remover y descartar todo el sobrenadante, dejando el pellet lo más seco posible. Para mejorar el fraccionamiento se debe remover todo el PBS antes de añadir CER I.
4. Homogeneizar el tejido en un volumen apropiado de CER I.

Cantidad de tejido (mg)	CER I (µl)	CER II (µl)	NER (µ) *
20	200	11	100
40	400	22	200
80	800	44	400
100	1000	55	500

5. Vortexear el tubo vigorosamente a velocidad máxima por 15 segundos para resuspender totalmente el pellet celular. (Para obtener mejores resultados, vortexear por más tiempo hasta que se disperse totalmente el pellet).
6. Incubar en hielo por 10 minutos. Para obtener un mejor fraccionamiento se debe aumentar el tiempo de incubación.
7. Añadir CER II previamente enfriado al tubo.
8. Vortexear el tubo por 5 segundos.
9. Incubar en hielo por 1 minuto. Para obtener un mejor fraccionamiento se debe aumentar el tiempo de incubación.
10. Vortexear el tubo por 5 segundos.
11. Centrifugar por 5 minutos a velocidad máxima a 4°C (aprox 16000g). Para obtener una mayor concentración en la fracción nuclear se debe aumentar el tiempo de centrifugado.
12. Transferir inmediatamente el sobrenadante (extracto CITOPLÁSMICO) a un tubo limpio y pre enfriado. Guardar este tubo en hielo hasta su almacenamiento (Si es un volumen grande hacer alicuotas). Para un mejor fraccionamiento asegurarse de remover todo el extracto citoplásmico antes de continuar a la extracción nuclear. Volver a centrifugar y remover el exceso de extracto nuclear.

13. Para un mejor fraccionamiento se puede enjuagar los nucleos con CER I o PBS, para eliminar restos de fracción nuclear. Suspender el pellet generado en el paso 11 (que contiene los núcleos) en NER previamente enfriado. Para obtener una mayor concentración de la fracción nuclear se puede disminuir de 2 a 4 veces el volumen de NER utilizado.
14. Vortexear por 15 segundos. Poner la muestra en hielo y continuar vortexeando por 15 segundos cada 10 minutos, por un total de 40 minutos. Para obtener un mejor fraccionamiento se debe aumentar el tiempo de incubación y de vórtex.
15. Centrifugar el tubo a máxima velocidad (aprox 16000g) por 10 minutos.
16. Inmediatamente transferir el sobrenadante (extracto NUCLEAR) a un tubo limpio previamente enfriado. Poner en hielo.
17. Guardar los extractos a -80°C hasta su uso.

Nota: se pueden alargar todos los tiempos de incubación, los tiempos de centrifugado y de vortex siempre que se considere necesario, en general ayudan a un mejor fraccionamiento. Mantener siempre en frío.

Protocolo de SDS-PAGE

1. Se prepara un gel separador al 12% (acrilamida 12%, Tris 0,375M pH 8.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, Temed 0.05%) y el gel concentrador 3.75% (acrilamida 3.75%, Tris 0,126M pH 6.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, Temed 0.05%).
2. Las proteínas son descongeladas en hielo antes de la corrida y se centrifugan a velocidad máxima 15 minutos. Se preparan las muestras para la corrida (50 µg) con un buffer de carga casero 5X (50% glicerol, 5% SDS, 0,225 M Tris-Cl pH 6,8, 0,02% azul de bromofenol, 0,25 M DTT). Luego se hierven las muestras preparadas por 5 minutos para lograr una buena desnaturalización proteica.
3. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10–230 kDa) P7711S de New England Biolabs y Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Markers High Molecular Weight range (14300-220000 Da) de Amersham Biosciences de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.
4. Se arma la cuba, y se utiliza como buffer de corrida Tris-Glicina 1X-SDS (Glicina 192mM, Tris base 25mM, SDS 0,1%).
5. La corrida electroforética se realiza a 25 mA durante 2hs.

Gel Separador 12%

Reactivo	Para 10 ml	Para 8 ml
H ₂ O	3,3 ml	2,64 ml
Tris 1,5M pH 8,8	2,5 ml	2 ml
Acrilamida 30 %	4 ml	3,2 ml
SDS 10%	100 µl	80 µl
APS 10%	100 µl	80 µl
Temed	5 µl	4,5 µl

Gel Concentrador STACKING 3,75% (5 ml)

Reactivo	Volumen
H ₂ O	3,85 ml
Tris 1,5M pH 6,8	0,42 ml
Acrilamida 30 %	0,625 ml
SDS 10%	50 µl
APS 10%	50 µl
Temed	5 µl

Protocolo de Visualización de Proteínas con solución de Rojo Ponceau

1. Después de la transferencia pasar la membrana a un taper con PBS 1X
2. Sacar el PBS y poner el rojo unos minutos (2 aprox). Guardar el rojo ponceau para reutilizar.
3. Lavar con agua hasta ver las bandas. Escanear
4. Lavar con agua hasta sacar todo.
5. También se puede lavar con PBS

Preparación (50 ml)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Polvo rojo ponceau	0.25 g	0.5%
Ácido Acético	500 µl	1%

Enrasar con agua miliRo y guardar a temperatura ambiente.

Protocolo de Visualización de Proteínas con solución de Azul de Coomassie

1. Para teñir: sumergir en la solución de tinción (volumen grande) por 4 hs a temperatura ambiente con agitación suave.
2. Para desteñir: sumergir en la solución etanol/acético por 4 hs a temperatura ambiente con agitación suave. Cambiar la solución 3 o 4 veces.
3. Guardar la solución de Coomassie para su reutilización.

Preparación (100 ml)

Reactivo	Cantidad
Polvo Coomassie Brilliant Blue R250	0.25 g
Metanol (o etanol)	45 ml
H ₂ O	45 ml
Ácido Acético	10 ml

Disolver 0.25g de polvo en 90 ml de etanol:agua (1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético. Filtrar a través de un Whatman N°1

Protocolo de Visualización de Proteínas con Nitrato de plata

1. Colocar el gel en solución de Fijación (12% Acido Acético, 50% Etanol, 0.5 ml/L Formaldehído 37%) durante 1 h con agitación lenta o durante toda la noche.
2. Lavar tres veces en solución 50% Etanol durante 5, 10 y 15 min.
3. Enjuagar rápidamente (entre 15 y 30 segundos) con la solución de Tiosulfato (0.2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
4. Enjuagar tres veces rápido con agua nano Q.
5. Incubar durante 30 min en la solución de nitrato de plata (2g/L AgNO_3 , 0,75 ml/L Formaldehído 37%).
6. Enjuagar tres veces rápido con agua nano Q.
7. Revelar las proteínas en la solución de revelado (30 g/L Na_2CO_3 , 20 ml/L solución Tiosulfato, 0,5 ml/L Formaldehído 37%).
8. Detener el revelado con solución de Fijación.
9. Para tiempos prolongados de conservación del gel, incubarlo en solución de conservación (Etanol 25%, Glicerol 3%).

Buffers y soluciones utilizadas en Western BlotTris-glicina 5X pH 8,3 (500 ml)

Reactivo	Cantidad	Concentración final en 1X
Glicina (PM=75.07 g/mol)	36g	192mM
Tris (PM=121,14 g/mol)	7,57g	25mM

Disolver en agua miliRo y chequear el pH. Guardar a 4°C

Buffer de corrida: Tris-glicina-SDS 0,1% (1.4L)

Reactivo	Cantidad
Tris-glicina 5X	280 ml
SDS 10%	14 ml (0.1% final)

Completar con agua miliRo. Guardar a 4°C.

Buffer de transferencia: Tris-glicina 1X-etanol 12%-SDS 0,025% (1.2L)

Reactivo	Cantidad
Tris-glicina 5X	240 ml
Etanol 100%	144 ml
SDS 10%	3 ml

Enrasar con agua miliRo y enfriar.

TBS pH 7,5 (2L)

Reactivo	Cantidad
Tris base	4,84 g
NaCl	58,48 g
HCl	Aprox 3,1 ml

Una vez disueltos el tris y el NaCl ajustar el pH a 7,5. A diferencia del PBS que se prepara 5X, el TBS es 1X esta es la concentración final a la que la vamos a usar. Guardar a 4°C.

Solución de Bloqueo: TBS-Leche descremada 5% (50ml)

Reactivo	Cantidad
TBS	50 ml
Leche	2,5 g

Solución de lavado: TBS-Tween 0,05% (1L)

Reactivo	Cantidad
TBS	1L
Tween	500 ul

Solución para dilución de Anticuerpos: TBS-T-BSA 3% (10ml)

Reactivo	Cantidad
TBS-T	10 ml
BSA	0,3 g

Guardar a -20°C