



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación del estrés oxidativo y la muerte neuronal
en un modelo de isquemia cerebral *in vitro*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

SELENE GARCÍA DE LA CADENA FARFÁN



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Marina Gavilanes Ruíz
Vocal	Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Secretario	Prof. María Elena Chánez Cárdenas
1er Suplente	Prof. Criselda Mendoza Milla
2do Suplente	Prof. Aurora Lara Núñez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Patología Vascular Cerebral. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la beca de pregrado otorgada por la fundación Armstrong.

Dra. María Elena Chánez Cárdenas

ASESORA

Selene García de la Cadena Farfán

SUSTENTANTE

DEDICATORIAS

A mi papá, por su cariño y comprensión.

A mi mamá, por su apoyo incondicional.

A Kar, por los buenos momentos que hemos pasado juntas, por hacerme ver la vida diferente, pero sobre todo gracias, por ser mi hermana.

A mi hermano, por aguantarme todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el orgullo de formar parte de ella, por ser la mejor universidad de América Latina y por darme la oportunidad de seguir creciendo.

A la Facultad de Química y a todos mis profesores, gracias por ayudarme a cumplir esta meta.

A la Dra. María Elena Chánéz Cárdenas, gracias por toda la confianza desde el primer día en que nos conocimos, por el tiempo que dedicaste en revisar este trabajo, por siempre estar dispuesta a escucharme y resolver mis dudas, por cada uno de tus consejos, pero sobre todo, gracias por ser para mi, no sólo mi asesora sino una amiga.

A la Dra. Marina Gavilanes, por despertar en mi el interés en la Bioquímica y por sus valiosos comentarios. Al Dr. Francisco J. Plasencia, por el tiempo dedicado en la revisión y corrección de este trabajo.

A la Dras. Penélope Aguilera y Perla Maldonado, por su ayuda incondicional, sus consejos, su amistad y por crear un excelente ambiente de trabajo dentro del laboratorio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Adriana, Araceli, Ranferi, Daniel, Pablo y Carlos por los buenos momentos que pasamos juntos trabajando.

A mis amigos entrañables: Brenda Loaiza y Rodrigo Martínez, mil gracias por su amistad incondicional, por su confianza, lealtad y franqueza. Gracias también, por todos los momentos inolvidables que junto a ustedes he pasado.

A mis amigos de toda la vida: Judith, Karla y Armando, gracias porque a pesar del tiempo y la distancia me han brindado su apoyo y su amistad.

A mis amigos: Oswi, Paco, Aracne, Malena, Marú, Vanessa, Hortensia, Adalith, Betty, Mónica y Anahí por compartir su tiempo conmigo.

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-AMC	Ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina
AEBSF	4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluoruro
ASB	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CHAPS	(hidrato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
E-64	N-[N-(L-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina)
Gpx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico); 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LCRa sac	Líquido cefalorraquídeo artificial con sacarosa
LCRa s/sac	Líquido cefalorraquídeo artificial sin sacarosa
LCRa s/glu	Líquido cefalorraquídeo artificial sin glucosa
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
SOD	Superóxido dismutasa
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia

ÍNDICE	
RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	3
1.1 ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL	3
1.1.1 Tipos de EVC	4
1.2 MODELOS USADOS EN ISQUEMIA	6
1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL	8
1.3.1 Falla energética	8
1.3.2 Excitotoxicidad	9
1.3.3 Elevación intracelular de calcio	9
1.3.4 Generación de radicales libres	10
1.3.5. Inflamación	10
1.3.6 Inhibición de la síntesis de proteínas	11
1.3.7. Muerte neuronal	11
1.4 GENERALIDADES DE ESTRÉS OXIDATIVO	12
1.4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	12
1.4.1.1 Oxígeno singulete	13
1.4.1.2 Anión superóxido	13
1.4.1.3 Peróxido de hidrógeno	14
1.4.1.4 Radical hidroxilo	14
1.4.2 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO	14
1.4.2.1 Peroxinitrito	15
1.4.2.2 Óxido nítrico	15
1.4.3 DEFENSAS ANTIOXIDANTES	16
1.4.3.1 Superóxido dismutasa	16
1.4.3.2 Catalasa	17
1.4.3.3 Glutación peroxidasa	18
1.4.4 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN	19
1.4.4.1 Xantina oxidasa	20
1.4.4.2 Mitocondria	20
1.4.4.3 Leucocitos polimorfonucleares	20
1.4.4.4 Óxido nítrico sintasa	21
1.4.4.5 Ciclooxygenasa 2	21

II. JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVO GENERAL	23
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23
V. MÉTODOS	24
5.1 ANIMALES	24
5.2 DISECCIÓN DEL CEREBRO Y OBTENCIÓN DE REBANADAS	24
5.3 MODELO DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN <i>IN VITRO</i>	25
5.4 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR	25
5.4.1 Tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y extracción de formazán	25
5.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	26
5.5.1 Homogenización de las rebanadas	26
5.5.2 Cuantificación de proteínas totales	26
5.5.3 Actividad de catalasa (CAT)	27
5.5.4 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)	27
5.5.5 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	28
5.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3	29
5.7 RÉPLICA EN WESTERN	30
5.7.1 Detección de caspasa 3	30
5.7.2 Detección de ADP-ribosilación	31
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 VIABILIDAD CELULAR	33
6.2 ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	36
6.2.1 Actividad de Catalasa	36
6.2.2 Actividad de Glutatión peroxidasa	38
6.2.3 Actividad de Superóxido dismutasa	40
6.3 ACTIVIDAD DE CASPASA 3	44
6.4 DETECCIÓN DE ADP-ribosilación	47
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN

El daño cerebral por isquemia es el resultado de una reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral que provoca alteración en las funciones cerebrales. La pérdida del flujo sanguíneo causa daño cerebral a través de una serie de eventos que evolucionan en tiempo y espacio.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo es un evento importante que causa daño en el infarto cerebral isquémico. Lo anterior se debe a que comparado con otros órganos el cerebro parece ser particularmente vulnerable al estrés oxidativo. El estrés oxidativo que se induce durante la restitución del flujo sanguíneo o reperfusión, es un evento que exacerba el daño inducido por la isquemia cerebral. La reoxigenación provee de O₂ a las células para mantener la viabilidad neuronal pero también, ese O₂ sirve como sustrato para numerosas reacciones de oxidación en donde se producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

En los modelos de isquemia cerebral *in vitro* se ha observado una gran heterogeneidad entre los tiempos de isquemia y de reperfusión empleados. Considerando estas variaciones de los modelos *in vitro* y la falta de datos definitivos acerca de los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes durante la isquemia/reperfusión, surgió el interés de investigar la respuesta de las principales enzimas antioxidantes después de diferentes tiempos de isquemia y de reperfusión.

En este trabajo se utilizó un modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión cerebral utilizando rebanadas corticoestriatales de rata sometidas a privación de oxígeno y glucosa. Se evaluó la viabilidad celular (tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPx) y el mecanismo de muerte neuronal, a través de la detección fluorométrica de actividad de caspasa 3 y detección por réplica en western de caspasa 3 y ADP-ribosilación utilizando dos tiempos de isquemia (0.5 y 1.5 h) y diferentes tiempos de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h).

Se observó que el aumento en el tiempo de isquemia (1.5 h) generó alrededor de un 20 % más de daño en las rebanadas sometidas a isquemia/reperfusión. Fue posible observar una respuesta en la actividad de las principales enzimas antioxidantes (CAT, GPx y SOD).

Finalmente los resultados de actividad de caspasa 3 y de detección de ADP-ribosilación por réplica en western sugieren que el principal mecanismo de muerte neuronal en las rebanadas sometidas a 0.5 y 1.5 h de isquemia a los diferentes tiempos de reperfusión fue la necrosis.

I. ANTECEDENTES

1.1 ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es una interrupción súbita del flujo sanguíneo en cualquier área del cerebro como consecuencia de la obstrucción de un vaso sanguíneo, causada por arteriosclerosis (acumulación progresiva de calcio, colesterol y otras grasas en la pared de las arterias) o un coágulo; o bien debido a la ruptura de un vaso sanguíneo (Adams *et al.*, 1999).

La EVC constituye la tercera causa de muerte en los países industrializados y es considerada como la primera causa de invalidez a nivel mundial (Ruiz-Sandoval *et al.*, 2003). En México, la EVC ocupó en el 2003 el sexto lugar como causa de muerte en personas de 15 a 64 años con una tasa de 9.41 por 100,000 y contribuyendo al 3.6 % de las defunciones. En el grupo de personas de 65 y más años la EVC fue la tercera causa de muerte (sólo por abajo de la enfermedad isquémica del corazón y la diabetes) con una tasa de 387.9 por 100,000 contribuyendo al 8.2 % de las muertes (Ramírez *et al.*, 2007).

Existen factores de riesgo que predisponen a la EVC, dentro de los cuales existen factores de riesgo modificables y no modificables. Entre los **factores de riesgo no modificables**, se encuentran: la *edad*: se ha calculado que por cada década después de los 55 años se duplica el riesgo de EVC; el *sexo*: la incidencia de EVC es aproximadamente un 19 % mayor en los hombres que en las mujeres; la *raza*: la población negra tiene dos veces más la posibilidad de presentar EVC que los individuos de raza blanca, debido a que tienen una mayor incidencia de hipertensión arterial, sin embargo la incidencia es similar entre hispanos y blancos; la *herencia*: los miembros de una familia pueden tener una tendencia genética a factores de riesgo de EVC, tales como una predisposición heredada a la hipertensión o a la diabetes.

Dentro de los **factores de riesgo modificables**, la *hipertensión arterial* es el más importante de todos, evidenciado tanto por su frecuencia, como por el hecho de que controlándola adecuadamente se reduce el riesgo de EVC; *enfermedades cardíacas*: especialmente los casos de anomalías en las válvulas del corazón; *diabetes mellitus*: la diabetes es un factor de riesgo al

producir alteraciones en los vasos sanguíneos que a su vez derivan en hipertensión; *niveles altos de colesterol en la sangre*: los cuales pueden provocar arteriosclerosis; *accidentes isquémicos transitorios (AIT) previos*: en el 35 por ciento de los casos un AIT es seguido de EVC, aproximadamente la mitad de estos casos de EVC ocurren durante el año posterior al AIT; *tabaquismo*: el consumo de cigarrillos duplica el riesgo de una persona de sufrir una EVC al promover la arteriosclerosis y aumentar los niveles de factores de coagulación en la sangre, tales como el fibrinógeno. Además la nicotina y el dióxido de carbono del humo del cigarrillo dañan la pared endotelial del sistema cerebrovascular; *abuso de drogas*: el abuso de cocaína, anfetaminas y heroína aumenta entre 7 a 14 veces el riesgo de EVC, debido a que estas sustancias tóxicas pueden estrechar los vasos sanguíneos del cerebro y por lo tanto reducir el flujo sanguíneo; *consumo de alcohol*: un consumo elevado de alcohol es un factor de riesgo de EVC debido a que provoca un incremento en la presión sanguínea; *obesidad*: se ha sugerido que la obesidad aumenta el riesgo de EVC porque se asocia a su vez con hipertensión y altos niveles de lípidos; *terapia de reemplazo hormonal*: se ha encontrado que la terapia de reemplazo aumenta el riesgo de EVC; *uso de anticonceptivos orales*: los anticonceptivos orales, independientemente, no constituyen un factor de riesgo significativo, pero combinados con otros factores de riesgo, tales como el hábito de fumar, el riesgo de sufrir una EVC aumenta. (Chaves, 2000; Gárate-Salazar *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2007).

1.1.1 Tipos de EVC

En 1990 fue propuesta la "III clasificación de enfermedades cerebrovasculares" por el National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) con la finalidad de definir de forma precisa los tipos de EVC. Según su naturaleza, la EVC se puede presentar como isquemia o como hemorragia. Existe una mayor incidencia de EVC de tipo isquémico, aproximadamente 85 %, mientras que el tipo hemorrágico representa el 15 % de los casos (Díez-Tejedor *et al.*, 2001).

En un **evento vascular hemorrágico** lo que se produce es la ruptura de un vaso sanguíneo. La hemorragia puede ocurrir dentro de los hemisferios cerebrales, tallo cerebral o cerebelo denominándose "intraparenquimal" o bien en el espacio subaracnoideo sobre la superficie cerebral, denominándose "subaracnoidea". La causa más frecuente de ruptura de un vaso sanguíneo cerebral es la presencia de un aneurisma (dilatación permanente de una arteria ocasionada por la debilidad de su pared) (www.uco.mx/acerca/coordinaciones/cgic/cuadernos/infartocerebral.pdf).

Durante un **evento vascular isquémico**, la circulación de una parte del cerebro se interrumpe debido a la obstrucción de un vaso sanguíneo (Aguilar *et al.*, 2005), causada por arteriosclerosis o por un coágulo. La isquemia que involucra al cerebro completo y ocurre por la oclusión temporal de las arterias que irrigan la totalidad cerebral como son las arterias carótidas y las arterias vertebrales, se denomina "**isquemia cerebral global**". El daño resultante de este tipo de isquemia es difuso y afecta a neuronas que están en regiones más susceptibles al daño, como son la región CA 1 del hipocampo, el estriado, las capas 3, 5 y 6 de la corteza cerebral y el cerebelo. Aquella que afecta regiones restringidas del cerebro y se produce por la oclusión transitoria o permanente de la arteria cerebral media (ACM) se denomina "**isquemia cerebral focal**" (Massieu, 1999).

Después de la aparición de la isquemia cerebral focal es posible observar dos regiones morfológicas debido a que la reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el territorio isquémico. La completa pérdida del flujo sanguíneo produce una zona de infarto donde se observa muerte celular necrótica. La zona de infarto está rodeada por la zona de penumbra, la cual está localizada entre la zona de infarto y la zona no dañada o tejido irrigado normalmente. Las células de la zona de penumbra continúan irrigadas por arterias colaterales.

La penumbra es una zona potencialmente viable, en la que la integridad de la membrana celular se preserva y puede ser rescatada de su conversión a zona

de infarto (Figura 1). El período de tiempo durante el cual la penumbra persiste representa una ventana de oportunidad terapéutica y es el blanco para la intervención con tratamientos neuroprotectores (Crack *et al.*, 2005; Aguilera *et al.*, 2007).

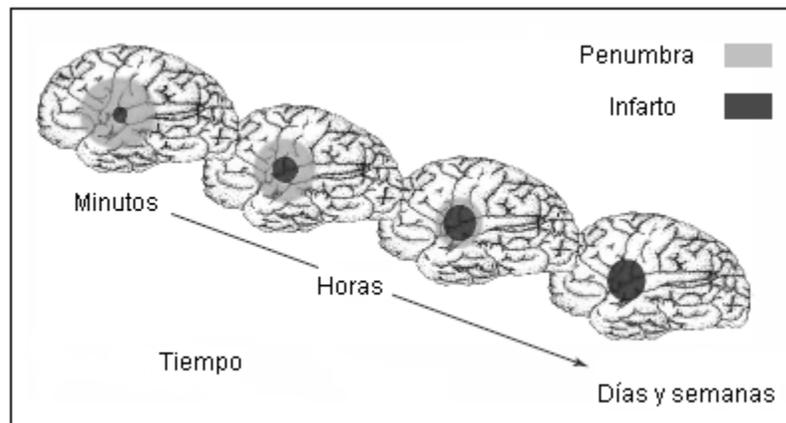


Figura 1. Evolución de zona de penumbra a zona de infarto en relación con el tiempo. Modificada de Dirnagl *et al.*, 1999

1.2 MODELOS USADOS EN ISQUEMIA

Para estudiar el daño isquémico han sido desarrollados modelos de isquemia *in vivo* e *in vitro*. Los **modelos de isquemia *in vivo*** generalmente usan ratas, ratones o gerbos en los cuales puede ser inducida la isquemia global o focal. Los modelos usados para inducir la isquemia global en ratas son la oclusión de cuatro vasos (OV-4) y dos vasos (OV-2), mientras que en gerbos se utiliza el modelo de oclusión de la arteria carótida bilateral (OACB). El modelo de isquemia cerebral focal involucra la oclusión de la arteria cerebral media (OACM). Tanto en el modelo global como focal la isquemia puede ser transitoria (cuando involucra un período de reperusión) o permanente (Hunter *et al.*, 1995; Small *et al.*, 2000).

Entre las ventajas de usar un modelo *in vivo* para evaluar el daño por isquemia cerebral se encuentran que, debido a las similitudes entre la circulación craneal de ratas y humanos, los resultados reflejan más lo observado en los pacientes (Hunter *et al.*, 1995), además se pueden hacer evaluaciones conductuales en los animales para complementar lo observado a través de histología. Entre las desventajas de usar modelos *in vivo* encontramos que es

necesario controlar más variables como son la presión arterial, la temperatura corporal, el flujo sanguíneo cerebral y los gases disueltos en sangre (Traystman, 2003), se necesita personal capacitado para llevar a cabo las cirugías, la variabilidad entre individuos es muy alta y se necesita más tiempo para la obtención de resultados.

Para los **modelos de isquemia *in vitro*** se utilizan cultivos primarios de neuronas/glia de corteza, hipocampo, cerebelo o hipotálamo que se extraen de embriones de rata o ratón y cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo. Además pueden ser utilizadas rebanadas de tejido cerebral principalmente de hipocampo, corteza y estriado (Hossmann, 2008). Los cultivos y las rebanadas son incubados en soluciones saturadas de O₂ 95%/CO₂ 5% y luego cambiados a soluciones con N₂ 95%/CO₂ 5%. Cuando la glucosa es mantenida en el buffer anóxico, el daño es denominado anoxia o hipoxia y cuando la glucosa es omitida, se denomina isquemia *in vitro* o privación de oxígeno y glucosa (Lipton, 1999).

Algunas de las ventajas de usar un modelo *in vitro* para evaluar el daño por isquemia cerebral son: un mejor control de algunas variables como la temperatura, la obtención de resultados en un menor tiempo y que se evita el uso de animales en el caso de cultivos celulares. Utilizar rebanadas cerebrales presenta además algunas ventajas sobre el uso de cultivos celulares. En las rebanadas se preserva la organización tridimensional y las características funcionales del tejido cerebral y por el contrario, en las células cultivadas se pierde la estructura anatómica del tejido original (Fekete *et al.*, 2008).

Entre las desventajas de usar un modelo *in vitro* se encuentran que la preparación de rebanadas está asociada con un severo trauma al tejido, así como también a un período de paro circulatorio antes de que la rebanada sea colocada en el medio de incubación. Además las preparaciones *in vitro* requieren medios de incubación, los cuales son sustancialmente diferentes del medio extracelular normal (Hossmann, 2008).

1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

El cerebro requiere un alto y constante suministro de oxígeno y glucosa para mantener la viabilidad y las funciones normales de las células. Por lo tanto, la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo en la isquemia cerebral desencadena una serie de eventos que finalmente llevarán a la muerte neuronal.

La cascada de eventos involucrados en la muerte neuronal después de un episodio isquémico son: 1) la pérdida de la actividad eléctrica neuronal como consecuencia de la interrupción de los procesos dependientes de ATP; 2) la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y el incremento intracelular de Ca^{2+} ; 3) la liberación masiva de aminoácidos excitadores y el consiguiente incremento de sus concentraciones en el espacio extracelular; 4) la inhibición de la síntesis de proteínas; 5) la generación de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno; 6) inflamación y 7) apoptosis (Dirnagl *et al.*, 1999; Aguilera *et al.*, 2007; Durukan *et al.*, 2007).

1.3.1 Falla energética

La disminución del flujo sanguíneo induce hipoxia e hipoglucemia. Al no haber aceptor final de electrones (oxígeno), se interrumpe la fosforilación oxidativa y consecuentemente la producción de ATP. Además se acumula lactato vía glucólisis anaerobia. La acidosis puede aumentar la formación de radicales libres, interferir con la síntesis de proteínas y empeorar el daño cerebral isquémico (Durukan *et al.*, 2007). La falla energética provoca que la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ sea deficiente, provocando la despolarización de la terminal presináptica. En estas condiciones se activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje incrementándose la concentración intracelular de este ión (Haces del Blanco *et al.*, 2005). El aumento de Ca^{2+} intracelular favorece la liberación de aminoácidos excitadores, principalmente glutamato y aspartato, incrementando su concentración en el espacio extracelular (Gundersen *et al.*, 2001). La acumulación de glutamato también se debe a una falla en los sistemas de recaptura y de la enzima que cataliza la conversión de glutamato a glutamina, ya que ambos dependen de ATP (Bonde *et al.*, 2005) (Figura 2).

1.3.2 Excitotoxicidad

El término excitotoxicidad se emplea para definir el daño celular inducido por la sobreexcitación de los receptores de glutamato (Olney, 1994). En el espacio extracelular el glutamato y el aspartato se unen a distintos tipos de receptores postsinápticos. Entre ellos, los receptores ionotrópicos que se han denominado de acuerdo a sus agonistas farmacológicos: el receptor de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloazol-4-propiónico (AMPA) y el receptor a kainato. Estos dos últimos receptores están acoplados a canales iónicos permeables a Na^+ , que al activarse provocan un incremento intracelular de este ión generando la despolarización de la neurona postsináptica. Además de Na^+ , también entra agua a la célula, lo que favorece la formación del edema celular. Por otro lado, al despolarizarse las neuronas, el ión magnesio que normalmente bloquea el receptor NMDA es removido y el receptor es activado por la unión del glutamato. La activación de estos receptores provoca la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al interior de la célula. Esta despolarización también favorece la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Camacho *et al.*, 2006), incrementándose de esta forma la toxicidad vía el exceso intracelular de Ca^{2+} (Figura 2).

1.3.3 Elevación intracelular de calcio

El Ca^{2+} puede entrar a la célula a través de los receptores de glutamato, principalmente los de tipo NMDA, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El aumento intracelular no sólo se debe a la entrada de Ca^{2+} , sino también a su liberación de organelos intracelulares: retículo endoplásmico y mitocondria (mecanismo mediado por el inositol trifosfato) (Neumar, 2000). La pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular genera la activación de una gran variedad de enzimas involucradas en la muerte neuronal entre las que se incluyen: fosfolipasas (A_2 y C), proteasas (calpaína), endonucleasas, proteína cinasa C, ciclooxygenasa y óxido nítrico sintasa (Bano *et al.*, 2007). El aumento citosólico de Ca^{2+} provoca además la entrada masiva de este ión a la mitocondria generando daño mitocondrial. La activación de ciertas

enzimas y el daño generado en la mitocondria contribuyen a la producción de radicales libres (Dirnagl *et al.*, 1999) (Figura 2).

1.3.4 Generación de radicales libres

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en el último orbital, lo que los hace altamente reactivos pues tienden ya sea a donar ese electrón a alguna molécula vecina o bien a remover un electrón de otra para que su último orbital quede completo (Halliwell, 2006).

Algunas de las enzimas activadas por calcio que producen radicales libres son: fosfolipasa A₂ y la óxido nítrico sintasa. La activación de la fosfolipasa A₂ produce la liberación de ácidos grasos libres, entre ellos el ácido araquidónico, el cual es metabolizado por la ciclooxigenasa 2 (COX-2) produciendo superóxido, hidroperóxidos y cicloperóxidos. La óxido nítrico sintasa utiliza arginina y oxígeno como sustratos para producir óxido nítrico (NO•). El NO• se combina rápidamente con el superóxido para generar el peroxinitrito, que es sumamente reactivo (Margaill *et al.*, 2005). Los radicales libres generados reaccionan irreversiblemente con varios constituyentes celulares tales como proteínas, dobles enlaces de fosfolípidos y ADN. Provocando peroxidación lipídica, daño a la membrana y mutaciones del genoma. Los radicales libres también sirven como importantes moléculas de señalización que provocan inflamación y apoptosis (Durukan *et al.*, 2007).

1.3.5. Inflamación

El incremento de radicales libres provoca la expresión de un número de genes proinflamatorios mediante la inducción de la síntesis de factores de transcripción como el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- κ B), el factor inducible por hipoxia 1 y el factor regulador de interferón 1. Por lo tanto, citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6) son activadas y secretadas después de la isquemia. Estas citocinas pueden inducir reacciones inflamatorias y también actuar como quimioatrayentes para leucocitos (Leker *et al.*, 2002). Además son expresadas moléculas de adhesión

intercelular 1 (ICAM-1), P-selectinas y E-selectinas (Bramlett *et al.*, 2004). Las moléculas de adhesión interactúan con receptores que se encuentran en la superficie de neutrófilos. Los neutrófilos se adhieren al endotelio, cruzan la pared vascular y entran al cerebro. Los macrófagos y monocitos siguen a los neutrófilos y migran dentro del cerebro isquémico. La inflamación puede contribuir al daño isquémico por varios mecanismos: la obstrucción microvascular por neutrófilos, la producción de mediadores tóxicos por las células inflamatorias activadas y las neuronas dañadas. En modelos de isquemia cerebral en roedores y en pacientes con EVC la infiltración de neutrófilos activa la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que produce NO[•]. Las neuronas isquémicas expresan ciclooxigenasa 2 (COX-2) y pueden producir TNF- α una citocina que puede exacerbar el daño isquémico. La microglia activada también debido a la producción de radicales libres tiene el potencial para producir neurotoxinas, incluyendo NO[•], especies reactivas de oxígeno y prostanoïdes tóxicos (Dirnagl *et al.*, 1999).

1.3.6 Inhibición de la síntesis de proteínas

Uno de los parámetros más sensibles a reducciones de flujo sanguíneo cerebral es la síntesis proteica que se inhibe profundamente durante la isquemia, ya sea focal o global, a pesar de que no se observan cambios en la morfología de los polirribosomas que permanecen agregados durante el período de la isquemia. Ello impide la nueva síntesis de proteínas que, de prolongarse durante suficiente tiempo, podría provocar un déficit en proteínas esenciales para la supervivencia celular (Planas, 1997).

1.3.7. Muerte neuronal

La muerte neuronal puede suceder por apoptosis o necrosis. La apoptosis es la “muerte programada” donde las células mueren de manera controlada en respuesta a la activación de programas genéticos específicos y requiere de energía. En cambio, la muerte por necrosis ocurre en las células con pérdida de ATP acompañada de aumento intracelular de calcio que resulta en la pérdida

completa de su habilidad para regular procesos homeostáticos. La isquemia interrumpe la integridad de la membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de citocromo C y la activación de caspasas (9 y 3) implicadas en la ejecución de la apoptosis.

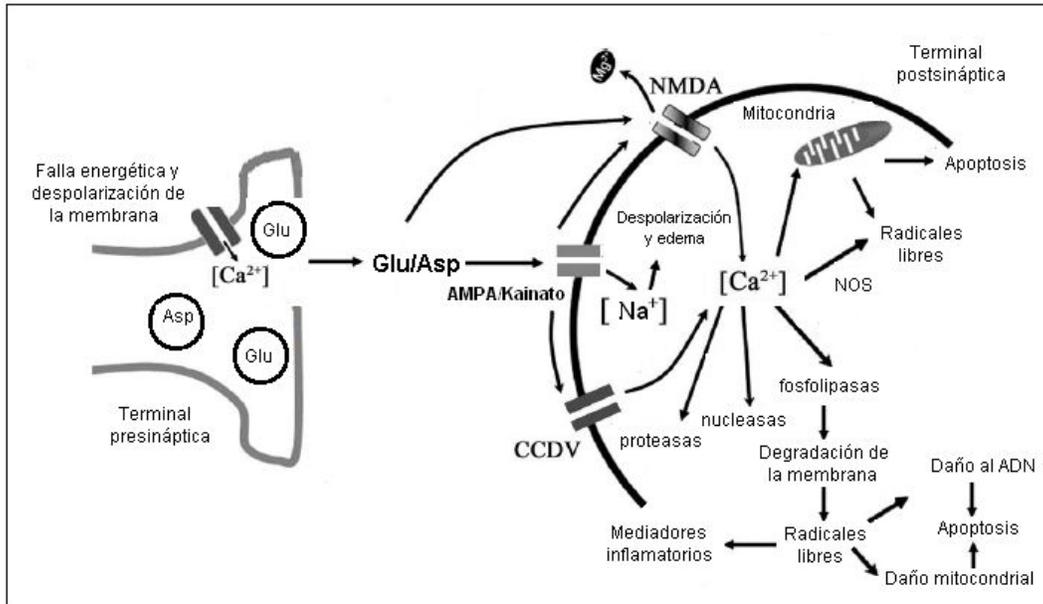


Figura 2. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Abreviaturas: Glu, glutamato; Asp, aspartato; AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico; NMDA, N-metil-D-aspartato; CCDV, canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje; NOS, óxido nítrico sintasa. Modificado de Camacho *et al.*, 2006

1.4 GENERALIDADES DE ESTRÉS OXIDATIVO

1.4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Aunque el oxígeno (O_2) es indispensable para los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones llega a ser tóxico. La toxicidad del O_2 se explica debido a la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO's). Estas especies derivadas del O_2 son más reactivas que éste en su estado basal de triplete. La mayor parte del O_2 que consumen los organismos aerobios se reduce a H_2O por el complejo de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta reducción parcial del oxígeno molecular vía univalente conduce a la generación de ERO's (Figura 3). Las principales ERO's son: las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , o sea, el oxígeno atómico, el

ozono, el oxígeno singulete y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Hansberg, 2002).

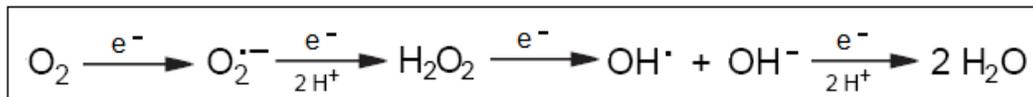


Figura 3. Reducción univalente del oxígeno

1.4.1.1 Oxígeno singulete

El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) se forma cuando uno de los electrones desapareados del oxígeno absorbe energía e invierte su rotación (giro). Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. El $^1\text{O}_2$ es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas, los lípidos y otros compuestos celulares (Lledías *et al.*, 2000).

1.4.1.2 Anión superóxido

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) se forma cuando el O_2 capta un electrón. Ésto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria salen de ésta y son captados por el O_2 . Esto ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ también puede ser producido por enzimas como la NADPH oxidasa, xantina oxidasa (XO), lipooxigenasa (LOX) y la P_{450} oxidasa. Contrario a lo que generalmente se piensa, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ es poco reactivo. Sólo reacciona a una tasa importante con las quinonas, los fenoles, con el fierro libre o unido a algunas proteínas, por ejemplo los centros [Fe-S] y también con otros radicales (el propio $\text{O}_2^{\cdot-}$, el óxido nítrico y los radicales fenoxi) (Hansberg, 2002).

1.4.1.3 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa. Aunque no es un radical libre, tiene una gran lipofilicidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición, para generar el radical hidroxilo. Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios (Nitan *et al.*, 2001).

1.4.1.4 Radical hidroxilo

El radical hidroxilo (OH^\bullet) es altamente reactivo causando más daño que cualquier otra ERO's, pero es muy inestable, de modo que su tiempo de vida media es muy corto e interactúa con las moléculas más cercanas a él. La formación del OH^\bullet se puede lograr fácilmente por la reacción de Haber-Weiss entre el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 catalizada por un metal de transición o a través de la reacción de Fenton cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , entonces se fragmenta y forma el OH^\bullet y el ión hidroxilo (OH^-) (Figura 4).

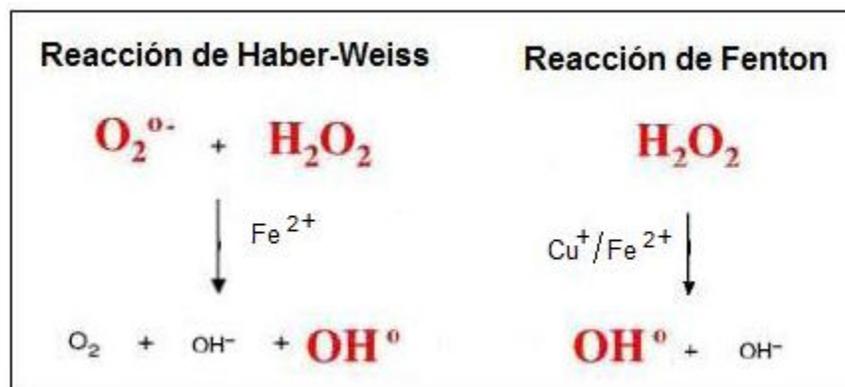


Figura 4. Formación del radical hidroxilo a través de las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton

1.4.2 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO

Además de las especies reactivas de oxígeno mencionadas, en la última década se ha descubierto que hay otras especies derivadas del nitrógeno que se

conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN's). Entre las ERN's se encuentran los radicales óxido nítrico y dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) y los no radicales como el ácido nitroso (HNO_2) y el peroxinitrito, entre otros.

1.4.2.1 Peroxinitrito

El peroxinitrito (ONOO^-) es una especie altamente citotóxica formada por la reacción entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el NO^\bullet . El ONOO^- reacciona con facilidad con el dióxido de carbono (CO_2) para formar el anión nitroso peroxicarboxilato (ONOOCO_2^-), también puede protonarse para formar el ácido peroxinitroso (ONOOH) que se homolisa en OH^\bullet y $\bullet\text{NO}_2$.

El ONOO^- o sus productos de reacción pueden oxidar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), liberar iones cobre por la destrucción de ceruloplasmina y atacar los residuos de tirosina de diferentes proteínas (Nordberg *et al.*, 2001).

1.4.2.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO^\bullet) es un gas incoloro relativamente soluble. Es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina, O_2 y NADPH (Figura 5). A concentraciones fisiológicas, el NO^\bullet funciona principalmente como segundo mensajero intracelular, siendo una de sus cualidades más conocidas el actuar como factor relajante del músculo liso (Porasuphatana *et al.*, 2003). El NO^\bullet no reacciona fácilmente con biomoléculas a pesar de tener un electrón desapareado, sin embargo, lo hace con otros radicales libres (por ejemplo, radicales peroxilo y alquilo), generando moléculas menos reactivas, por lo que funciona como atrapador de radicales libres (Nordberg *et al.*, 2001). También puede reaccionar con el O_2 , generando $\bullet\text{NO}_2$ y con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generando ONOO^- . Ambos compuestos son más oxidantes que el NO^\bullet (Hansberg, 2002).

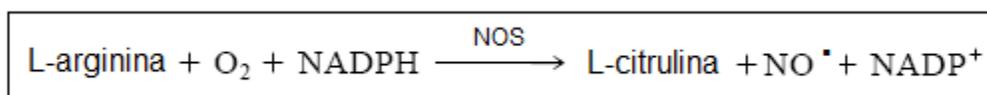


Figura 5. Síntesis de óxido nítrico

1.4.3 DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Por el potencial efecto destructivo de las ERO's y ERN's, la célula cuenta con defensas para evitar el daño oxidativo (Yu, 1994). Estos sistemas de detoxificación presentes en la célula pueden ser de tipo enzimático y no enzimático (Krinsky, 1992). Los antioxidantes no enzimáticos están representados por el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), bilirrubina, ácido úrico, carotenoides, flavonoides, entre otros. Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) (Margaill *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007). La hemo-oxigenasa (HO), se considera una enzima antioxidante, porque cataliza la degradación del grupo hemo (un pro-oxidante) para formar biliverdina (antioxidante), hierro y monóxido de carbono. Posteriormente, la biliverdina es transformada a bilirrubina (antioxidante) por la biliverdin reductasa (Dennery, 2000).

1.4.3.1 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante endógena que cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (reacción 1) (Danielisová *et al.*, 2005). Esto se logra a través de oxidaciones y reducciones sucesivas del metal de transición del sitio activo de la enzima, en un mecanismo de tipo ping-pong (Meier *et al.*, 1998).



Los mamíferos poseen tres isoformas de la SOD (Nozik-Grayck *et al.*, 2005) que se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos:

* **CuZn-SOD (SOD 1)**: es encontrada en el citoplasma de las células eucariotas (Yoon *et al.*, 2006). La SOD 1 es una metaloenzima homodimérica de 32 kDa. Su sitio activo contiene dos iones cobre y un ión zinc por molécula. Los iones cobre son requeridos para la actividad enzimática, mientras que el ión zinc no tiene una

función en el ciclo catalítico, pero ayuda a estabilizar a la enzima. El Cu^{2+} de la enzima es reducido por el superóxido para producir dioxígeno y el Cu^+ reducido de la enzima es posteriormente oxidado por otra molécula de superóxido para producir peróxido de hidrógeno (Choi *et al.*, 2005).

* **Mn-SOD (SOD 2):** se localiza en la mitocondria. Es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de Mn por subunidad. Durante la dismutación del superóxido el Mn^{3+} pasa a Mn^{2+} y regresa nuevamente a Mn^{3+} (Mac Millan-Crow *et al.*, 1998). La SOD 2 proporciona la primera línea de defensa contra la sobreproducción de superóxido de la mitocondria (Kim *et al.*, 2002).

* **SOD extracelular (EC-SOD):** es una glucoproteína que se ha encontrado en el espacio intersticial de tejidos y también en fluidos extracelulares. Aunque ocasionalmente es encontrada como un dímero, en la mayoría de las especies, la EC-SOD es un tetrámero de subunidades idénticas de 30 kDa. El tetrámero está compuesto de dos dímeros unidos a través de puentes disulfuro. La enzima contiene un átomo de cobre y uno de zinc por subunidad y ambos son requeridos para la actividad enzimática (Nozik-Grayck *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2008).

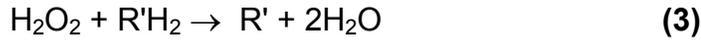
La SOD no es realmente una enzima destoxicante ya que el producto de su actividad, el H_2O_2 , es un agente tóxico. Sin embargo, la dismutación del anión superóxido es el primer paso de una cascada enzimática que conduce a su inactivación completa. El H_2O_2 generado es metabolizado por la catalasa y la glutatión peroxidasa.

1.4.3.2 Catalasa

La catalasa (CAT) es una hemoproteína tetramérica de 240 kDa. Se localiza principalmente en peroxisomas, en donde cataliza la dismutación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (reacción 2).



La catalasa participa también en la destoxificación de diferentes sustratos, por ejemplo: fenoles y alcoholes, vía la reducción acoplada de peróxido de hidrógeno (reacción 3).



Uno de los papeles antioxidantes de la catalasa es disminuir el riesgo de formación del radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno vía la reacción de Fenton catalizada por iones Cu^+ o Fe^{2+} . La catalasa se une a NADPH, el cual protege a la enzima de la inactivación e incrementa su eficiencia (Nordberg *et al.*, 2001).

1.4.3.3 Glutación peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) está formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína que es esencial para su actividad enzimática. La GPx (80 kDa) cataliza la reducción de hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2) usando glutatión reducido (GSH) (reacción 4), así protege a las células contra el daño oxidativo. De hecho, el metabolismo del glutatión es uno de los más importantes mecanismos de defensa antioxidantes (Matés *et al.*, 1999).



Hay cuatro principales isoenzimas de GPx dependientes de selenio en tejidos de mamíferos: la citosólica (GPx-1), la gastrointestinal (GPx-2), la plasmática (GPx-3) y la de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx-4). Son homotetrámeros con excepción de la GPx-4 que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras glutatión peroxidases (Takebe *et al.*, 2002; Fukuhara *et al.*, 2005). La GPx-4 es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol. Todas las GPx son capaces de reducir el

H₂O₂ y los hidroperóxidos de ácidos grasos. La GPx-1 es la enzima más abundante sobre todo en los eritrocitos, el hígado, los riñones y los pulmones. La GPx-3 no sólo está en el plasma sanguíneo, también se encuentra en la mayoría de secreciones corporales. Se sintetiza en el riñón y de ahí es liberada a la sangre. La GPx-2 sólo se encuentra en el epitelio del tracto digestivo y en el hígado (Hansberg, 2002). GPx-4 se expresa mayoritariamente en células del epitelio renal y en los testículos.

Se sabe que hay otras dos isoenzimas de GPx, llamadas GPx-5 y 6, que están presentes en tejidos de mamíferos. Aunque GPx-5 tiene una secuencia de nucleótidos similar con GPx-3, carece de selenocisteína en el sitio activo. GPx-6 ha sido identificada recientemente como una GPx dependiente de selenio en humanos y cerdos, tiene una estructura similar con GPx-4 (Fukuhara *et al.*, 2005).

1.4.4 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

La pérdida del balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes puede deberse a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno o bien, a una disminución en los sistemas antioxidantes, o a una combinación de estos factores. A tal condición se le denomina estrés oxidativo (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2006).

Comparado con otros órganos, el cerebro parece ser particularmente vulnerable al estrés oxidativo: (1) las células del cerebro humano utilizan 20% del oxígeno consumido por el cuerpo, pero éste constituye sólo el 2% del peso corporal total, indicando que el cerebro genera más radicales libres que otros tejidos, (2) varias regiones del cerebro contienen altas concentraciones de hierro, el cual puede catalizar la generación de radicales libres, (3) el cerebro es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, blancos para peroxidación de lípidos y (4) el cerebro posee sistemas antioxidantes con capacidad de protección de baja a moderada comparada con los del riñón o el hígado (Margaill *et al.*, 2005).

El estrés oxidativo que se induce durante la reperfusión, es un evento que exagera el daño inducido por la isquemia cerebral. La reoxigenación provee de O₂ a las células para mantener la viabilidad neuronal; pero también, ese O₂ sirve

como sustrato para numerosas reacciones de oxidación en donde se producen ERO's (Nita *et al.*, 2001). A continuación se describen las principales fuentes de ERO's y ERN's durante la isquemia cerebral:

1.4.4.1 Xantina oxidasa

Durante la isquemia los niveles de ATP disminuyen y éste se metaboliza progresivamente a ADP y AMP; a su vez, el AMP es degradado a adenosina y ésta a inosina. La inosina a su vez se degrada a hipoxantina. En condiciones isquémicas la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa a través de la oxidación de sus grupos tiol (-SH) o de proteólisis. Esta oxidasa produce especies reactivas de oxígeno como el superóxido y el peróxido de hidrógeno al oxidar la xantina o la hipoxantina (Massieu, 1999).

1.4.4.2 Mitocondria

Se ha observado *in vivo* que la mitocondria es la principal fuente de radicales libres durante la reperusión postisquémica. En ratones mutantes con una deficiencia en la enzima SOD 2 se aumenta la producción de $O_2^{\cdot-}$ y se exagera el infarto cerebral después de isquemia transitoria o permanente, mientras que la sobreexpresión de SOD 2 confiere resistencia a la peroxidación de lípidos de la membrana, cuantificado por niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, bajo condiciones fisiológicas normales y después de isquemia transitoria.

1.4.4.3 Leucocitos polimorfonucleares

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) tienen también un papel importante en la producción de radicales libres durante la reperusión postisquémica. Los PMN pueden contribuir a la producción de radicales libres a través de dos enzimas, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa que producen ácido hipocloroso (HClO) y $O_2^{\cdot-}$ respectivamente (Margaill *et al.*, 2005).

1.4.4.4 Óxido nítrico sintasa

Esta enzima sintetiza NO^\bullet a partir de arginina y oxígeno. El NO^\bullet puede reaccionar con $\text{O}_2^{\bullet-}$ para generar el ONOO^- .

1.4.4.5 Ciclooxygenasa 2

Otra fuente de ERO's es el metabolismo del ácido araquidónico por la enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2), una enzima que produce anión superóxido y prostanoïdes tóxicos.

II. JUSTIFICACIÓN

La reperusión después de la isquemia provoca muerte neuronal que ha sido asociada con un incremento en la producción de ERO's. Estas especies provocan daño oxidativo a macromoléculas celulares tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Así, la actividad de las enzimas antioxidantes en el tejido afectado por la isquemia/reperusión es particularmente importante como mecanismo de defensa endógeno contra el daño inducido por los radicales libres. Esta línea de defensa involucra la acción cooperativa de las tres principales enzimas antioxidantes: la SOD, la GPx y la CAT. Durante la reperusión, estas defensas antioxidantes endógenas pueden ser ineficaces como resultado de una sobreproducción de ERO's por las enzimas prooxidantes citosólicas y la mitocondria y una degradación de antioxidantes (Homi *et al.*, 2002).

En los modelos de isquemia cerebral *in vitro* se ha observado una gran heterogeneidad entre los tiempos de isquemia y de reperusión empleados. Durante el período de isquemia cuando las rebanadas son colocadas en soluciones carentes de glucosa y burbujeadas con nitrógeno es común utilizar tiempos que van desde 5 hasta 120 min y para la reperusión cuando las rebanadas son incubadas en medio oxigenado y con glucosa se utilizan períodos de tiempo más largos (2 a 24h) (Mathews *et al.*, 2000; De La Cruz *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2004; Fernández-López *et al.*, 2005). Considerando estas variaciones en los modelos *in vitro* y la falta de datos definitivos acerca de los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes durante la isquemia/reperusión, surgió el interés de investigar la respuesta de las principales enzimas antioxidantes después de diferentes tiempos de isquemia y de reperusión en un modelo *in vitro* de rebanadas corticoestriatales y la relación con la activación de caspasas y ADPribosilación.

III. HIPÓTESIS

- En el modelo de isquemia cerebral *in vitro* al aumentar el tiempo de reperfusión aumentará el daño celular, reflejándose en una disminución de la viabilidad celular y una respuesta en la actividad de las enzimas antioxidantes.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta de la viabilidad celular, la actividad de enzimas antioxidantes y el mecanismo de muerte neuronal en un modelo de isquemia cerebral *in vitro* utilizando dos tiempos de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de 0.5 y 1.5 h de isquemia y tiempo variable de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) sobre la viabilidad celular.
- Evaluar el efecto de 0.5 y 1.5 h de isquemia y tiempo variable de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).
- Identificar el mecanismo de muerte neuronal a los tiempos de isquemia y reperfusión evaluados para viabilidad celular y actividad de enzimas antioxidantes.

V. MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Los animales se mantuvieron con ciclos de 12 h luz/ 12 h oscuridad y con libre acceso al agua y al alimento.

5.2 DISECCIÓN DEL CEREBRO Y OBTENCIÓN DE REBANADAS

Los animales se anestesiaron con una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico 63 mg/Kg de peso. Para cada uno de los animales se siguió el siguiente procedimiento: La rata se colocó en posición dorsal sobre una superficie fría, se realizó una incisión ventral para exponer el corazón y se perfundió con líquido cefalorraquídeo artificial con sacarosa (LCRa sac) (sacarosa 215.5 mM, glucosa 30 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 3 mM y MgCl₂ 10 mM pH 7.4) frío durante 90 seg introduciendo una jeringa en el ventrículo izquierdo y realizando una incisión en la aurícula derecha. Se cortó la cabeza y se colocó en una solución fría de LCRa sac. Se extrajo el cerebro colocándolo en LCRa sac frío, se realizó un corte para desechar el cerebelo y el tallo cerebral. Se colocó en la base de un vibratomo *Leika* VT1000S y se mantuvo sumergido en LCRa sac frío. Se realizaron cortes coronales de 500 µm, obteniendo 5 rebanadas conteniendo tejido cortical y cuerpo estriado. Las rebanadas obtenidas se sometieron a un período de preincubación durante 30 min en líquido cefalorraquídeo artificial sin sacarosa (LCRa s/sac) (NaCl 107.75 mM, glucosa 30 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 3 mM y MgCl₂ 10 mM pH 7.4) a temperatura ambiente. Posteriormente, las rebanadas se incubaron durante 30 min en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) (NaCl 119 mM, glucosa 30 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1.5 mM pH 7.4) a 32°C.

En todos los medios se mantuvo un burbujeo constante con O₂ 95% / CO₂ 5%.

5.3 MODELO DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN IN VITRO

Las rebanadas se incubaron 0.5 o 1.5 h en líquido cefalorraquídeo artificial sin glucosa (LCRa s/glu) (NaCl 134 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1.5 mM pH 7.4) a 32°C burbujeado con N₂ 95% / CO₂ 5%. Para inducir la reperfusión las rebanadas isquémicas se incubaron durante 1, 1.5, 2, 3, 6 u 8 h en LCRa a 32 °C burbujeado con O₂ 95% / CO₂ 5%. Como controles se emplearon rebanadas de una misma rata incubándolas 0.5 o 1.5 h en LCRa a 32°C burbujeado con O₂ 95% / CO₂ 5% e incubadas después a los distintos tiempos de reperfusión en el mismo medio. Transcurrido el tiempo de reperfusión las rebanadas se congelaron a -70°C para realizar posteriormente y por separado la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes, la determinación de actividad de caspasa 3 y la réplica en western de la caspasa 3 y la ADP-ribosilación. En el caso de la determinación de viabilidad celular, las rebanadas se utilizaron inmediatamente.

5.4 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

5.4.1 Tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y extracción de formazán

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el método de Preston & Webster (2000). Cada rebanada se incubó con TTC al 2% en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 durante 30 min a 37°C con agitación y protegido de la luz. Se lavó dos veces con solución salina. Se agregó una solución de etanol y dimetil sulfóxido (EtOH/DMSO 1:1) (20 mL por cada gramo de tejido). Se incubó 24 h a temperatura ambiente con agitación y cubriendo de la luz. Transcurrido el tiempo se agitó ligeramente cada tubo y se tomaron 100 µL de extracto diluyendo con 900 µL de EtOH/DMSO fresco. La absorbencia se determinó empleando un espectro *Beckman* DU[®] 530 a una longitud de onda de 485 nm. Para calcular el % de daño se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ daño} = 100 \times [1 - ((\text{Absorbencia de tejido isquémico})/(\text{Absorbencia de tejido control}))]$$

5.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

5.5.1 Homogenización de las rebanadas

Cada rebanada se homogenizó con 500 μ L de amortiguador de lisis (Tris 20 mM pH 7.9, sacarosa 0.5 mM y NaCl 30 mM) agregando una solución de inhibidores de proteasas (AEBSF 104 mM, aprotinina 0.08 mM, leupeptina 2 mM, bestatina 4 mM, E-64 1.4 mM y pepstatina A 1.5 mM) utilizando un homogenizador con punta de teflón *Wheaton* adaptado a un motor de taladro. En un tubo se colocaron 100 μ L del homogenado y se agregaron 25 μ L de tritón X-100 al 1%. Se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C en una centrífuga refrigerada *Eppendorf* 5417R. Se separó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteína total y la actividad de la enzima catalasa. El homogenado restante se centrifugó en las mismas condiciones. Se separó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteína total y la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa.

5.5.2 Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó del método de Lowry *et al.* (1951). Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} - proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina. La reducción del reactivo de Folín-Ciocalteau también ocurre en medio básico por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, en donde el cobre actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folín-Ciocalteau es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Se realizó una curva patrón utilizando un estándar de albúmina de suero de bovino (ASB) con concentraciones de 5 a 50 μ g/mL. La absorbencia se determinó a 660 nm.

5.5.3 Actividad de catalasa (CAT)

Se utilizó el método de Aebi (1984) que mide la desaparición de H_2O_2 a 240 nm (Figura 6)



Figura 6. Reacción para medir la actividad de CAT

Se mezclaron en una celda de cuarzo 25 μL del sobrenadante con 725 μL de H_2O_2 30 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7. Se leyó inmediatamente la absorbencia a 240 nm cada 30 seg durante 2 min. Como blanco se utilizó amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7. Se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa. Los resultados se expresan como $k/\mu\text{g}$ proteína.

$$k/\mu\text{g prot} = \frac{[(1/t) \cdot \text{Log}(A_1/A_2)]/25}{\mu\text{g prot}/\mu\text{L sobrenadante}}$$

Donde t = intervalo de tiempo medido, A_1 y A_2 son las absorbencias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 .

5.5.4 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

Se empleó el método de Lawrence & Burk (1976), en el cual la GPx cataliza la reducción del H_2O_2 acoplado a la oxidación del GSH a GSSG, el cual a su vez es reducido por la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH. La disminución de la concentración de NADPH se detectó a 340 nm (Figura 7).

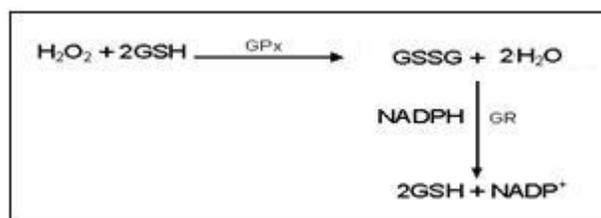


Figura 7. Reacción utilizada para medir la actividad de GPx

Se mezclaron en una celda de cuarzo 100 μL de sobrenadante con 800 μL de mezcla de reacción (EDTA 1 mM, NaN_3 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y 1 U de GR/mL en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7). De igual forma se preparó un ensayo inespecífico con 100 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. Se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 100 μL de H_2O_2 30 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 e inmediatamente se leyó la absorbencia a 340 nm cada 30 seg durante 3 min. Como blanco se utilizó amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. La actividad de GPx se expresa como U/ μg proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NADPH por min.

$$\text{U}/\mu\text{g prot} = \frac{([\Delta A_{340}/\text{min}]_{\text{muest}} - [\Delta A_{340}/\text{min}]_{\text{inesp}})/(6.22 \cdot 100)}{\mu\text{g prot}/\mu\text{L sobrenadante}}$$

Donde $\Delta A_{340}/\text{min}$ representa los cambios de absorbencia por minuto de la muestra y de la reacción inespecifica, respectivamente.

5.5.5 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó por el método de Oberley & Spitz (1984). El fundamento para medir la actividad de esta enzima se basa en la competición de la SOD con el nitroazul de tetrazolio (NBT) por los iones superóxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa (XO). Debido a que el NBT es reducido al interaccionar con los iones superóxido formando un compuesto colorido (formazán) que absorbe a 560 nm, la actividad de la SOD es directamente proporcional al grado de inhibición del NBT (Figura 8).

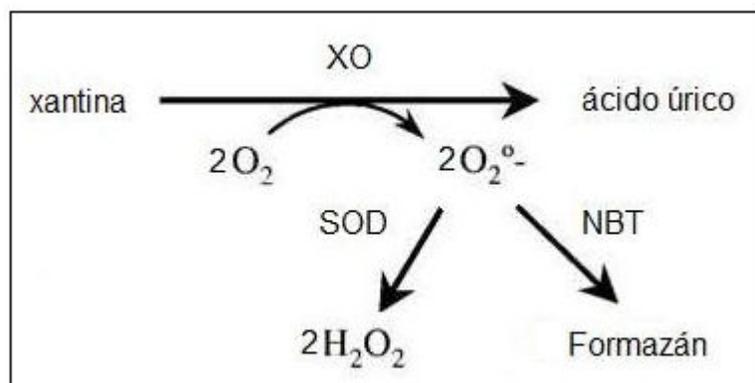


Figura 8. Reacción utilizada para medir la actividad de SOD

Se preparó una mezcla de reacción (xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μM , Na_2CO_3 49 mM y ASB 0.006%) y xantina oxidasa (2.5 mg/mL en $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$). Se colocaron 815 μL de la mezcla de reacción en todos los tubos. Se adicionaron 165 μL de la dilución 1 a 100 del sobrenadante en amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.8. Se inició la reacción con la adición de 20 μL de xantina oxidasa. De la misma forma se preparó un blanco para cada muestra sin xantina oxidasa. Se preparó además un tubo de 100% de reducción del NBT, con xantina oxidasa pero sin dilución del sobrenadante. Todos los tubos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción agregando 330 μL de CuCl_2 . Se leyó la absorbencia a 560 nm. Los datos se expresan como U/ μg proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

$$\text{U SOD}/\mu\text{g prot} = \frac{[(A_{100\% \text{ red}} - (A_M - A_{\text{Blco}})) / (0.5 \cdot A_{100\% \text{ red}})] / 165}{\mu\text{g prot} / \mu\text{L sobrenadante}} \cdot 100$$

Donde $A_{100\% \text{ red}}$ representa la absorbencia del tubo de 100% de reducción del NBT. A_M y A_{Blco} son las absorbencias de la muestra y su blanco respectivamente.

5.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3

Para determinar la actividad de caspasa 3 las rebanadas se homogenizaron en 400 μL de amortiguador de lisis para caspasas (HEPES 20 mM pH 7, DTT 5

mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0.1% p/v, tritón X-100 0.1% v/v, PMSF 1 mM, aprotinina, pepstatina y leupeptina 1 µg/mL). Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se cuantificaron proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951). En un tubo de ensayo se mezclaron: 500 µL de solución estándar (HEPES 100 mM pH 7, sacarosa 10% p/v, CHAPS 0.1% p/v, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinina, pepstatina y leupeptina 1 µg/mL), 60 µg de proteína del sobrenadante de las muestras y 0.025 mM de Ac-DEVD-AMC sustrato específico para la caspasa 3 (solución stock 6 mM en DMSO). De la misma manera se prepararon un blanco y un control positivo. Este control positivo es un homogenado de células inducidas para activación de caspasas (el control positivo fue donado por el Dr. Julio Morán, con un cultivo celular tratado con estaurosporina. Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Se incubaron a 37°C durante 15 min con agitación y cubriendo de la luz. Se detuvo la reacción colocando los tubos en hielo y agregando acetato de sodio al 4% en 0.2 M de ácido acético. Se leyó la intensidad de fluorescencia (excitación 370 nm, emisión 455 nm) en un fluorómetro *Perkin Elmer Precisely* LS55 cada 0.1 seg durante 1 min. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

5.7 RÉPLICA EN WESTERN

5.7.1 Detección de caspasa 3

Para los ensayos de réplica en western cada rebanada se homogenizó con 500 µL de amortiguador de lisis (Tris 20 mM pH 7.9, sacarosa 0.5 mM y NaCl 30 mM) agregando una solución de inhibidores de proteasas (AEBSF 104 mM, aprotinina 0.08 mM, leupeptina 2 mM, bestatina 4 mM, E-64 1.4 mM y pepstatina A 1.5 mM). Se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se separó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteína total y el sobrenadante restante se procesó para la detección de caspasa 3 y ADP-ribosilación por réplica en western.

Para cada una de las muestras se siguió el siguiente procedimiento: en un tubo se mezclaron el sobrenadante con amortiguador muestra (1:1) 2x (Tris-HCl

25 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.1%) y se hirieron durante 4 min. Se prepararon geles de acrilamida en un soporte *Bio-Rad* con el gel concentrador al 4% (acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%, Tris-HCl 0.5 M con SDS 0.4% pH 6.8, PSA 10% y TEMED) y el gel separador al 12% (acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%, Tris-HCl 1.5 M con SDS 0.4% pH 8.8, PSA 10% y TEMED) según el método de Laemmli (1970). Se montaron en una cámara de electroforesis. Se cargaron en cada pozo del gel 100 μ g de proteína del sobrenadante previamente desnaturalizado y se corrió la electroforesis durante 30 min a 70 V y durante 1 h a 200 V. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P, Millipore durante 1.5 h a 350 mA. Para comprobar que la transferencia fue completa, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (Ponceau S 0.5%, CH_3COOH 1% v/v, NaOH 200 μ M y CH_3CN 20% v/v) y se destiñeron con agua destilada. Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 3% en amortiguador de fosfatos salino PBS (NaCl 137 mM, KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, y KCl 2.7 mM) durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación. Se incubaron con el anticuerpo anti-caspasa 3 (1:738) en PBS con leche al 3% durante 24 h a 4°C. Las membranas se lavaron dos veces con agua destilada durante 10 min, agitación y a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:4000) durante 1.5 h con agitación y a temperatura ambiente. Después se realizaron dos lavados con agua destilada durante 10 min, a temperatura ambiente y agitación y otros dos lavados de 5 min con Tween 20 al 0.05% en PBS en las mismas condiciones. Finalmente las membranas se enjuagaron con agua destilada. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron usando un sistema de detección que emplea quimioluminiscencia *Immobilon Western, Millipore*.

5.7.2 Detección de ADP-ribosilación

Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5M y Tween-20 0.05%) durante 2 h, a temperatura ambiente y con agitación. Se incubaron con el anticuerpo anti-

poliADPribosa (1:500) en TTBS durante 24 h a 4°C. Las membranas se lavaron 4 veces en TTBS durante 15 min cada una con agitación y a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:8000) durante 1 h, a 37°C y con agitación. Después de la incubación, las membranas se lavaron nuevamente. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron usando el sistema de detección antes mencionado.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar (DE). Los datos obtenidos de viabilidad celular, determinación de actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y actividad de caspasa 3 se analizaron con el programa Prism 2.01, Graph Pad (San Diego, CA) usando una prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 VIABILIDAD CELULAR

En los ensayos de viabilidad celular, actividad de enzimas antioxidantes, actividad de caspasa 3 y réplica en western se utilizaron dos tiempos de isquemia (0.5 y 1.5 h) y diferentes tiempos de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h).

Para evaluar la viabilidad celular las rebanadas se incubaron con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio un compuesto incoloro, el cual es reducido por la enzima succinato deshidrogenasa de las mitocondrias del tejido viable a 1,3,5-trifenilformazán, un compuesto de color rojo que se extrae con una mezcla de solventes y se detecta mediante espectrofotometría.

Utilizando **0.5 h de isquemia** y diferentes tiempos de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) se observó que la viabilidad celular disminuyó significativamente (disminución de la absorbencia promedio) en las rebanadas sometidas a isquemia comparadas con sus controles. En las rebanadas expuestas a 2 h de reperfusión no se observaron diferencias significativas con su control. Esto representa una disminución del 50.54, 45.58, 41.91, 60.92, 54.01 y 49.03% para cada tiempo de reperfusión comparado con su control (Figura 9).

Al aumentar el tiempo de reperfusión hasta 3, 6 y 8 h la viabilidad celular disminuyó significativamente (0.1851 ± 0.0140), (0.1845 ± 0.0423) y (0.1883 ± 0.0326) con respecto al grupo de isquemia con 1 h de reperfusión (0.4765 ± 0.0695). Aunque con 3, 6 y 8 h de reperfusión existe una diferencia con respecto a sus controles, la viabilidad celular de los propios controles (0.4737 ± 0.0299), (0.4012 ± 0.0606) y (0.3695 ± 0.0714) fue menor comparada con el control de 1 h (0.9635 ± 0.1099) (Figura 9).

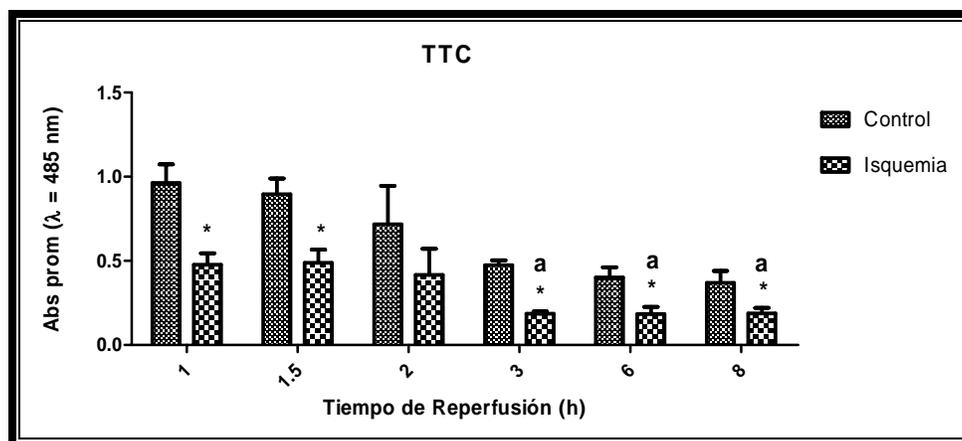


Figura 9. Efecto de 0.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperusión sobre la viabilidad celular. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=4 para cada grupo). *P<0.05 vs su grupo control. ^aP<0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de reperusión.

Utilizando **1.5 h de isquemia** y los mismos tiempos de reperusión se observó que la absorbencia promedio disminuyó significativamente en las rebanadas expuestas a 1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h de reperusión comparadas con sus controles. Esto representa una disminución del 61.95, 74.92, 69.16, 74.06, 72.73 y 86.71% para el respectivo tiempo de reperusión (Figura 10). Comparando el daño por isquemia utilizando 0.5 y 1.5 h, observamos que a mayor tiempo de isquemia (1.5 h) se genera alrededor de un 20 % de mayor daño a los mismos tiempos de reperusión (Figura 10).

A partir de 3, 6 y 8 h de reperusión hay una disminución significativa en la absorbencia promedio (0.1369 ± 0.0150), (0.1214 ± 0.0329) y (0.0534 ± 0.0259) contra el grupo de isquemia con 1 h de reperusión (0.2380 ± 0.0212). Además a partir de 3, 6 y 8 h de reperusión también se observa una disminución en la viabilidad celular de los controles (0.5278 ± 0.0537), (0.4453 ± 0.0804) y (0.4019 ± 0.0914) comparado con el control después de 1 h de reperusión (0.6255 ± 0.1089), lo que indica que utilizar mayor tiempo de reperusión aumenta considerablemente la muerte neuronal (Figura 10).

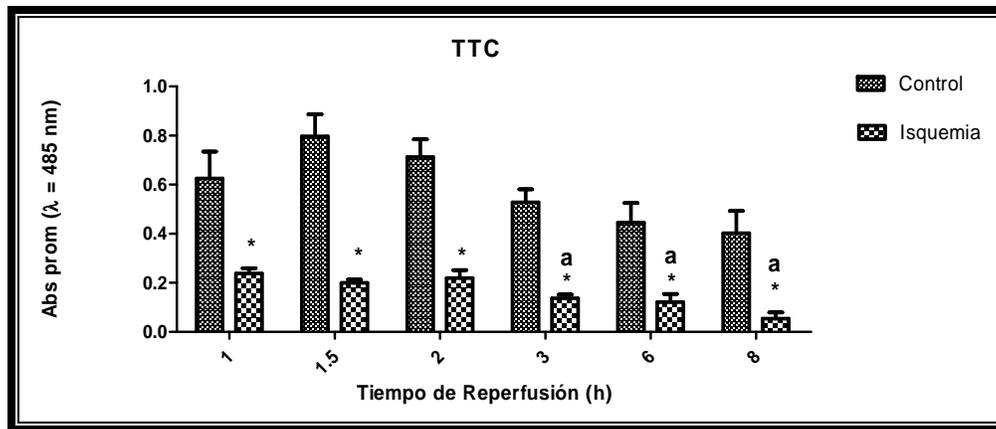


Figura 10. Efecto de 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos reperusión sobre la viabilidad celular. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=4 para cada grupo). *P<0.05 vs su grupo control. ^aP<0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de reperusión.

En un modelo de isquemia/reperusión *in vivo*, Ramírez (2007) observó que después de 3 h de reperusión el área de infarto ya no aumentaba considerablemente. En nuestro modelo se observó que la viabilidad celular de las rebanadas sometidas a 0.5 y 1.5 h de isquemia, ya no disminuyó después de 3 h de reperusión. Resultados similares se observaron en sus respectivos controles, lo que sugiere que la incubación de las rebanadas por tiempos prolongados, aún oxigenando, resulta en una muerte celular considerable.

Con ambos tiempos de isquemia se observó que la viabilidad celular de las rebanadas sometidas a isquemia/reperusión disminuyó significativamente comparada con sus controles. En nuestro modelo las rebanadas son incubadas en un medio libre de glucosa y burbujeado con nitrógeno (isquemia), para después ser incubadas en un medio con glucosa y burbujeado con oxígeno (reperusión). Durante este período de reperusión se incrementa dramáticamente la producción de radicales libres (Nita *et al.*, 2001; Margail *et al.*, 2005), ésto debido a que el tejido cerebral isquémico al estar en contacto nuevamente con el oxígeno (reperusión), está sujeto al desencadenamiento de reacciones que favorecen la producción de radicales.

6.2 ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

6.2.1 Actividad de Catalasa

Con el fin de determinar la respuesta antioxidante a los diferentes tiempos de isquemia y de reperfusión en las rebanadas cerebrales, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, GPx y SOD. Estas tres enzimas intracelulares trabajan en conjunto para contrarrestar el estrés oxidativo generado por la isquemia/reperfusión. La SOD metaboliza el $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , mientras que la CAT y la GPx rompen el H_2O_2 terminando el ciclo de neutralización del $O_2^{\bullet-}$ (Homi *et al.*, 2002). La CAT reacciona eficientemente con el H_2O_2 para formar H_2O y O_2 ; y con donadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles) con actividad de peroxidasa (Matés *et al.*, 1999). Para determinar la actividad de la CAT se utilizó el método de Aebi (1984) que mide la desaparición de H_2O_2 a 240 nm.

Durante la isquemia cerebral y al inicio de la reperfusión se ha observado una disminución en la actividad de la CAT (Schaller *et al.*, 2004; Margail *et al.*, 2005). En un modelo de isquemia global después de 15 min de isquemia y 3 h de reperfusión se observó una disminución en la actividad de la CAT en la región del hipocampo y del estriado (Homi *et al.*, 2002). Por otro lado, usando el mismo modelo, pero con 20 min de isquemia y 1 o 24 h de reperfusión se observó un aumento en la actividad de la CAT en el hipocampo (Naga *et al.*, 2007). En este trabajo, utilizando **0.5 h de isquemia** y diferentes tiempos de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) no se observaron cambios en la actividad de la CAT en las rebanadas sometidas a isquemia comparadas con sus respectivos controles (Figura 11). Después de 2 y 3 h de reperfusión aumentó significativamente la actividad de la enzima ($1.774E-3 \pm 1.306E-4$) y ($2.048E-3 \pm 3.771E-4$) respectivamente, comparando con el grupo de isquemia con 1 h de reperfusión ($1.051E-3 \pm 3.75E-4$). Este aumento se mantuvo a las 6 y 8 h de reperfusión (Figura 11).

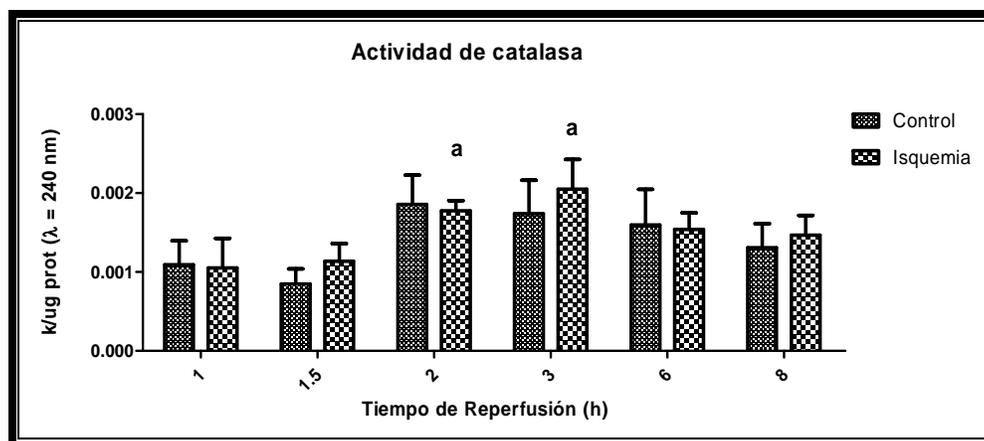


Figura 11. Efecto de 0.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperusión sobre la actividad de la CAT. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=4 para cada grupo). ^aP<0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de reperusión.

El aumento en la actividad de la catalasa después de someter a las rebanadas a 0.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperusión, contrasta con lo reportado por otros grupos (Nita *et al.*, 2001), donde se ha observado que la actividad disminuye. Es importante notar que también se observó un aumento significativo en la actividad de las rebanadas control a partir de 2 h de reperusión lo cual sugiere que esta respuesta de las células no es debida totalmente al período de isquemia.

Después de incubar las rebanadas durante **1.5 h de isquemia** y distintos tiempos de reperusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) la actividad de la CAT no presentó cambios significativos en los grupos de isquemia comparado con su control (Figura 12). Sin embargo, a partir de 2 h de reperusión se observó una disminución en la actividad de la enzima en los grupos de isquemia y sus controles. Se observó además una disminución significativa en la actividad de la CAT en los grupos de isquemia que se sometieron a 6 y 8 h de reperusión ($1.255E-3 \pm 1.88E-4$) y ($1.054E-3 \pm 1.35E-4$) respectivamente, comparados con el grupo de isquemia con 1 h de reperusión ($1.593E-3 \pm 1.83E-4$) (Figura 12).

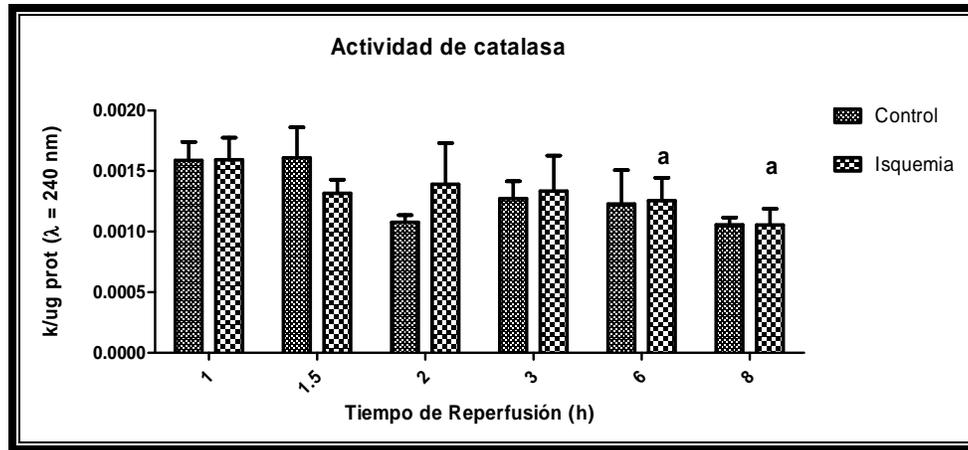


Figura 12. Efecto de 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos reperusión sobre la actividad de la CAT. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=5 para cada grupo). ^aP<0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de reperusión.

Cuando las rebanadas fueron sometidas a 1.5 h de isquemia se observó una disminución en la actividad de la CAT, que concuerda con lo reportado por Schaller (2004) y Margail (2005). A pesar de que disminuyó la actividad de las rebanadas isquémicas la disminución de sus controles indica que después de cierto tiempo es inevitable que se genere muerte neuronal a pesar de que las rebanadas continúen oxigenándose. La disminución en la actividad puede ser consecuencia de los radicales libres generados durante la isquemia/reperusión, ya que éstos pueden oxidar a la CAT provocando su inactivación.

6.2.2 Actividad de Glutación peroxidasa

La GPx protege a las células de los efectos tóxicos de hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) catalizando su descomposición en H₂O usando como cofactor al glutación reducido (GSH). Para determinar la actividad de la GPx se empleó el método de Lawrence & Burk (1976), en el cual la GPx cataliza la reducción del H₂O₂ acoplado a la oxidación del GSH a GSSG, el cual a su vez es reducido por la glutación reductasa (GR) en presencia de NADPH. La disminución de la concentración de NADPH se detectó a 340 nm.

En un modelo de isquemia global y varios períodos de reperusión (20, 60 y 240 min) se ha observado una disminución en la actividad de la GPx (Islekel *et al.*,

1999). Por otro lado, usando el mismo modelo, pero con 20 min de isquemia y 1 o 24 h de perfusión se observó un aumento en la actividad de la GPx en la región del hipocampo (Naga *et al.*, 2007). En un modelo *in vitro* utilizando rebanadas de 1 mm expuestas a 120 min de privación de oxígeno y glucosa (POG) la actividad de la GPx aumenta un 25% (De la Cruz *et al.*, 2004). En las rebanadas sometidas a **0.5 h de isquemia** y varios tiempos de perfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) no se observaron diferencias en la actividad de GPx entre los grupos de isquemia y sus controles. Se observó una disminución significativa de la actividad de GPx en los grupos con 1.5 ($6.431E-5 \pm 1.273E-5$), 2 ($5.771E-5 \pm 3.297E-6$), 3 ($4.999E-5 \pm 1.422E-5$), 6 ($4.199E-5 \pm 5.728E-5$) y 8 ($3.858E-5 \pm 1.410E-5$) h de perfusión comparados con el grupo de isquemia sometido a 1 h de perfusión ($1.069E-4 \pm 1E-5$). Una disminución similar se observó en los respectivos controles (Figura 13).

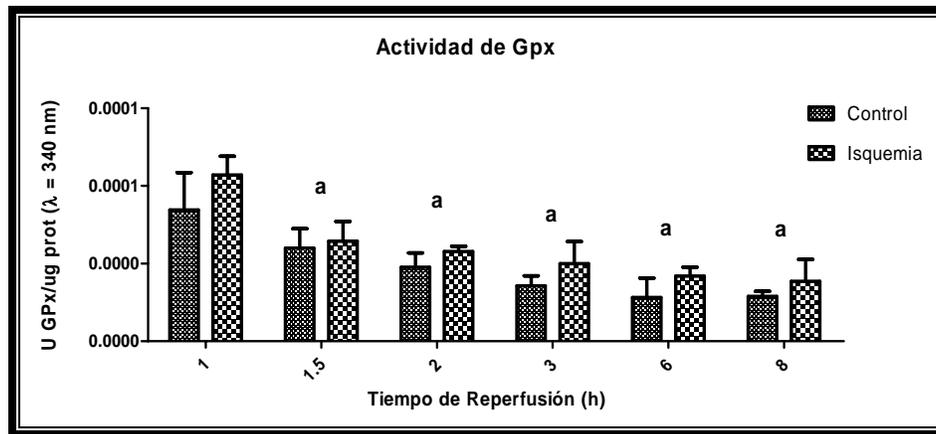


Figura 13. Efecto de 0.5 h de isquemia y diferentes tiempos de perfusión sobre la actividad de la GPx. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=4 para cada grupo). ^aP(0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de perfusión).

En las rebanadas sometidas a **1.5 h de isquemia** y los mismos tiempos de perfusión tampoco se encontraron cambios significativos en la actividad de GPx en los grupos de isquemia y sus controles. Se observó una disminución significativa en la actividad de GPx después de 1.5 ($3.7239E-05 \pm 3.9028E-06$), 3 ($5.6576E-05 \pm 3.5549E-06$), 6 ($5.434E-05 \pm 6.6023E-06$) y 8 ($5.9943E-05 \pm 7.756E-06$) h de perfusión comparando con el grupo de isquemia con 1 h de perfusión ($7.0984E-5 \pm 5.501E-06$) (Figura 14).

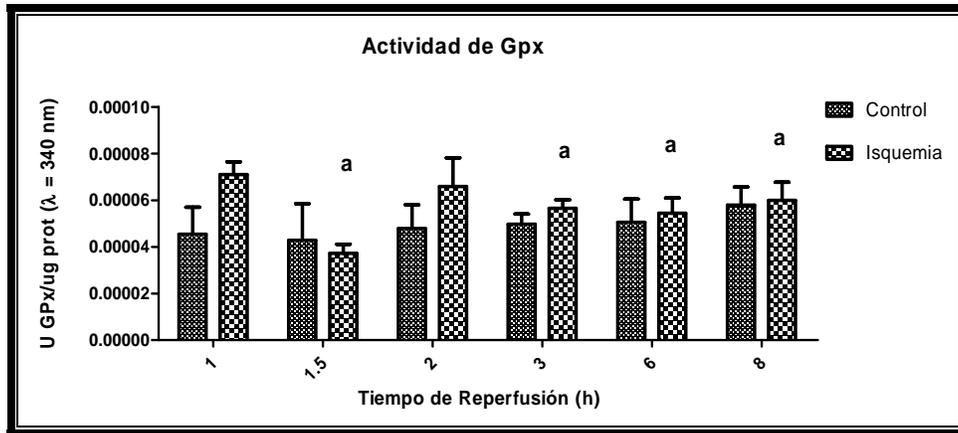


Figura 14. Efecto de 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos reperusión sobre la actividad de la GPx. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=5 para cada grupo). ^aP<0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de reperusión

En las rebanadas sometidas a 1.5 h de isquemia se observó desde el primer tiempo de reperusión evaluado (1 h) una disminución considerable de la actividad enzimática ($7.0984E-5 \pm 5.501E-06$) comparada con las rebanadas expuestas a 0.5 h de isquemia y el mismo período de reperusión ($1.069E-4 \pm 1E-5$). Estos resultados confirman lo obtenido en los ensayos de viabilidad celular que indica que 1.5 h de isquemia genera un mayor daño celular, que se ve reflejado en este caso, desde las primeras horas de reperusión.

Con ambos tiempos de isquemia y al someter a las rebanadas a distintos tiempos de reperusión se observó una disminución en la actividad enzimática, esta disminución también se observó en los propios controles lo que indica una muerte celular progresiva a lo largo del tiempo de incubación.

La disminución observada en la actividad de GPx al someter a las rebanadas a 0.5 y 1.5 h de isquemia puede deberse a la oxidación de dicha enzima. La GPx es sensible a la oxidación por $ONOO^-$ y $O_2^{\bullet -}$. El $ONOO^-$ es un potente oxidante que puede provocar la oxidación del residuo de selenocisteína presente en el sitio activo de la enzima y en consecuencia provocar una disminución en su actividad (Blum *et al.*, 1985; Padmaja *et al.*, 1998).

6.2.3 Actividad de Superóxido dismutasa

La SOD es una enzima antioxidante endógena que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y constituye la primera línea de defensa contra las ERO's formadas durante la isquemia/reperfusión. La actividad de SOD se determinó por el método de Oberley & Spitz (1984). Se ha observado que durante la isquemia cerebral y al inicio de la reperfusión hay una disminución en la actividad de la SOD (Nita *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2004; Margaille *et al.*, 2005). En un modelo de isquemia global en ratas después de 15 min de isquemia y 3 h de reperfusión se observó una disminución en la actividad de la SOD en el hipocampo y el estriado (Homi *et al.*, 2002). En otro estudio, con 15 min isquemia global y 2, 24 y 48 h de reperfusión, observaron sólo una disminución significativa de la CuZn-SOD durante la isquemia (Drgová *et al.*, 2004). Por otro lado, en un modelo de isquemia cerebral global utilizando 5, 15, 30 y 60 min de oclusión y 30 min de reperfusión, se observó un aumento significativo en la actividad de la CuZn-SOD a los 60 min del inicio de la lesión isquémica (López *et al.*, 2004). Después de incubar las rebanadas durante **0.5 h de isquemia** y 1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h de reperfusión no se observaron diferencias importantes en la actividad de la SOD entre los grupos de isquemia y sus controles. Por otro lado, la actividad de la SOD disminuyó significativamente después de 2 (1.4205±0.0644), 3 (1.0846±0.1168), 6 (1.4048±0.1126) y 8 (1.2360±0.0830) h de reperfusión, comparando con el grupo de isquemia expuesto a 1 h de reperfusión (2.3140±0.4874) (Figura 15).

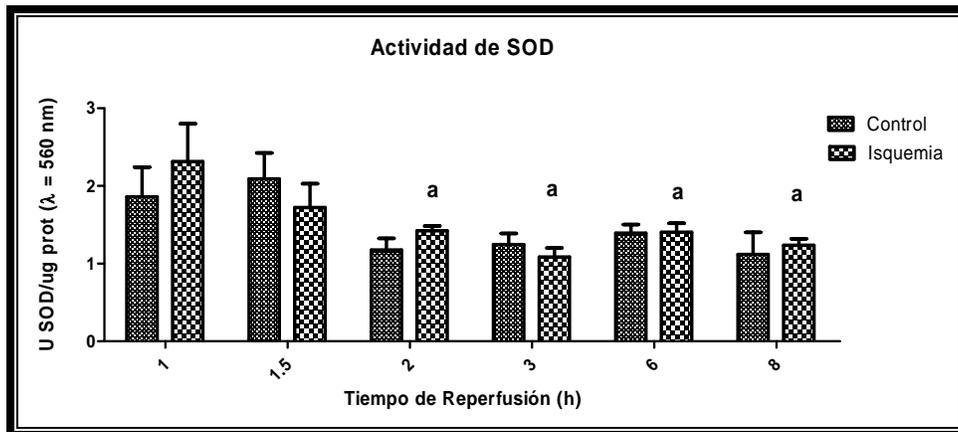


Figura 15. Efecto de 0.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión sobre la actividad de la SOD. Los valores se presentan como la media ± DE (n=4 para cada grupo). ^aP<0.05 vs grupo de isquemia con 1 h de reperfusión.

Aunque es posible observar una disminución en la actividad de la SOD a partir de las 2 h de reperfusión, esta disminución se mantuvo prácticamente constante al aumentar el tiempo de reperfusión. Esto concuerda con los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad celular donde se observó que después de 3 h de incubación se genera muerte celular considerable a pesar de que las rebanadas continúan oxigenándose. En este caso, como las células de las rebanadas están muriendo, aumentar el tiempo de reperfusión no tiene ya efecto sobre la actividad enzimática.

La disminución observada en la actividad de SOD puede explicarse por un aumento de H₂O₂ que ataca el residuo de histidina presente en el sitio activo de la enzima, disminuyendo de esta forma su actividad (Mukherjee *et al.*, 2007).

Utilizando **1.5 h de isquemia** y los mismos tiempos de reperfusión no se encontraron diferencias en la actividad de la SOD en los grupos de isquemia y sus respectivos controles. Después de incubar las rebanadas durante 1.5 (1.2992±0.8674), 2 (1.9004±0.5375), 3 (1.5440±0.1800), 6 (1.2507±0.3500) y 8 (1.5082±0.4214) h de reperfusión no se observaron cambios en la actividad de la SOD comparando con las rebanadas expuestas a 1 h de reperfusión (1.6670±0.3445) (Figura 16).

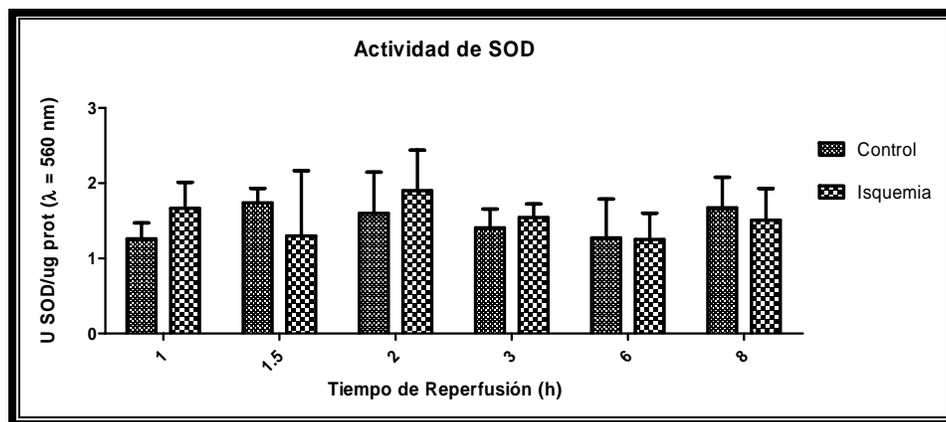


Figura 16. Efecto de 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos reperfusión sobre la actividad de la SOD. Los valores se presentan como la media ± DE (n=5 para cada grupo).

En el caso de las rebanadas sometidas a 1.5 h de isquemia, una mayor producción de radicales libres podría estar generando la inhibición de la SOD desde las primeras horas de reperfusión. Se sabe que la producción de radicales es continua y proporcional con la duración de la isquemia (Nita *et al.*, 2001). Esto concuerda con lo obtenido al evaluar la actividad de GPx después de 1.5 h de isquemia, en donde se observó una disminución en la actividad enzimática al inicio de la reperfusión.

Las defensas enzimáticas contra las ERO's involucran la acción cooperativa de las tres principales enzimas antioxidantes intracelulares: la SOD, la CAT y la GPx. Esta cooperación involucra además una protección de la CAT y la GPx hacia la SOD protegiéndola de la inactivación por H₂O₂. Esta última también puede ser inactivada por ONOO⁻. Recíprocamente, la SOD protege a las enzimas CAT y GPx contra la inhibición por O₂^{•-}. Además se ha observado que una disminución en la actividad de la SOD es paralela a una disminución en la actividad de la GPx (Blum *et al.*, 1985; Homi *et al.*, 2002).

La aparente disminución observada al evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes se mantiene constante al aumentar el período de reperfusión, lo cual concuerda con los resultados observados en la viabilidad celular. La disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes se debe probablemente a los radicales libres generados, los cuales atacan el sitio activo de las principales enzimas antioxidantes.

En los resultados de actividad de las enzimas antioxidantes no se encontraron diferencias significativas entre los grupos sometidos a isquemia/reperfusión y los controles. Hay reportes en los que se ha observado una disminución de la actividad enzimática de la SOD y la CAT pero solamente en la región del hipocampo y del estriado que son las regiones más vulnerables al daño generado por la isquemia, por otro lado no se observan diferencias en la actividad enzimática en el cerebelo y la corteza (Homi *et al.*, 2002). Esto nos indica que en nuestro modelo al usar rebanadas corticoestriatales las regiones tienen respuestas diferentes a la isquemia lo cual posiblemente no nos permita observar diferencias significativas entre rebanadas control y aquellas expuestas a isquemia/reperfusión.

El hecho de que no se observen cambios durante los diferentes tiempos de reperfusión puede deberse a que durante la reperfusión la producción de radicales libres se da principalmente en la etapa temprana cuando el oxígeno es suministrado a la región isquémica (Nita *et al.*, 2001). Pero también hay datos en donde este incremento de ERO's se mantiene durante un tiempo después de iniciada la reperfusión. Peters y colaboradores (1998) empleando un modelo de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) durante 1 h observaron un aumento en la producción de ERO's después de 20 min de iniciado el período de reperfusión y este incremento se mantuvo durante las siguientes 2 h. Por su parte Dirnagl y colaboradores (1995) encontraron que con 20 min de isquemia cerebral global *in vivo* se incrementa la producción de ERO's durante la reperfusión y que estos niveles se mantienen después de 2 h.

Además de evaluar la actividad de las enzimas oxidantes otro método alternativo que se podría usar para evaluar el estrés oxidativo inducido por los diferentes tiempos de isquemia y de reperfusión es la lipoperoxidación empleada como marcador de daño oxidativo. La peroxidación de lípidos puede ser evaluada por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método evalúa el estrés oxidativo a través del malondialdehído, que es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica (Matés *et al.*, 1999). Otro método podría ser evaluar de manera indirecta el estrés oxidativo midiendo la disminución de la concentración de glutatión total (glutatión oxidado y glutatión reducido) (Lerouet *et al.*, 2002).

6.3 ACTIVIDAD DE CASPASA 3

Los resultados de viabilidad celular indican que existe una muerte celular y que ésta es mayor conforme aumenta el tiempo de isquemia. Para investigar si la muerte celular ocurría por apoptosis o por necrosis se decidió usar un marcador de muerte apoptótica (actividad de caspasa 3) y un marcador de muerte necrótica (ADP ribosilación).

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que existen como zimógenos en las células (Dirnagl *et al.*, 1999). La activación de las caspasas

puede tener lugar en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares (Jordán, 2003). Las caspasas involucradas en la apoptosis son generalmente divididas en dos categorías, las caspasas iniciadoras, las cuales incluyen a las caspasas 2, 8, 9 y 10 y las caspasas efectoras, las cuales incluyen a las caspasas 3, 6 y 7. Todas las caspasas son producidas en las células como zimógenos inactivos y deben someterse a una activación proteolítica durante la apoptosis. La activación de una caspasa efectora (como la caspasa 3 o 7) es llevada a cabo por una caspasa iniciadora (como la caspasa 9) a través de un corte después de un residuo de ácido aspártico (Asp) que separa la subunidad grande de la pequeña. Las caspasas iniciadoras, sin embargo, son autoactivadas. Una vez activadas, las caspasas efectoras son responsables del corte proteolítico de un amplio espectro de blancos celulares, que conducen finalmente a la muerte celular (Shi, 2002). Entre los sustratos de las caspasas se encuentran: elementos del citoesqueleto, enzimas encargadas de reparar o degradar el ADN celular, factores de transcripción y proteínas reguladoras (Jordán, 2003). Las caspasas 1 y 3 parecen tener un papel fundamental en la apoptosis mediada por la isquemia (Dirnagl *et al.*, 1999).

En el caso de la caspasa 3, la caspasa inactiva es un precursor de 32 kDa. El corte proteolítico en el residuo Asp 175 genera dos subunidades conocidas como p17 y p11. Tanto el precursor inactivo como los fragmentos de 17 y 11 kDa pueden ser detectados por réplica en western. Por otro lado la actividad de caspasa puede ser seguida utilizando sustratos específicos.

Para determinar la actividad de caspasa 3 usamos el sustrato fluorogénico ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC). Este sustrato sufre proteólisis y genera 7-amino-4-metilcumarina (AMC). Al liberarse el AMC emite fluorescencia a 460 nm (longitud de onda de excitación 360 nm). De este modo, la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sustrato procesado y por tanto, a la actividad de caspasa 3 presente en la muestra.

La actividad de caspasa 3 utilizando **0.5 h de isquemia** y diferentes tiempos de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) no presentó cambios significativos

entre los grupos de isquemia y sus controles ni entre los diferentes tiempos de reperfusión empleados (Figura 17).

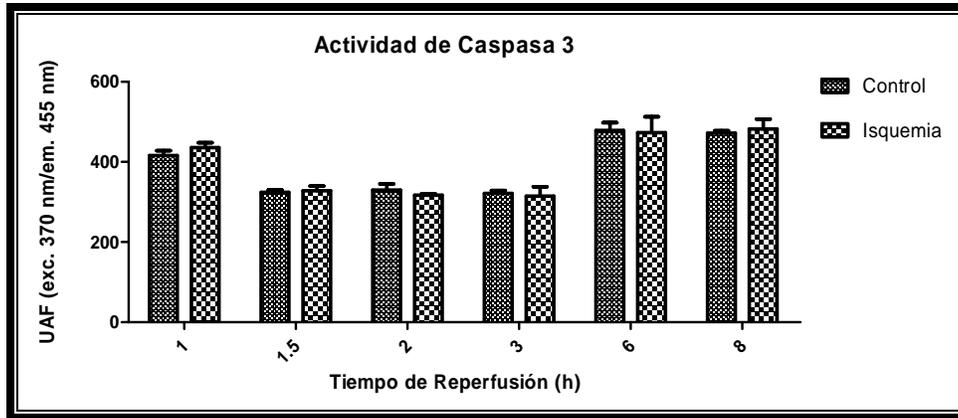


Figura 17. Efecto de 0.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión sobre la actividad de la caspasa 3. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=4 para cada grupo).

Utilizando **1.5 h de isquemia** y los mismos tiempos de reperfusión no se observaron cambios significativos en la actividad de caspasa 3 entre los grupos de isquemia y sus respectivos controles. Después de 1.5, 2, 3, 6 y 8 h de reperfusión no hay cambios en la actividad de caspasa 3 con respecto al grupo de isquemia sometido a 1 h de reperfusión (Figura 18).

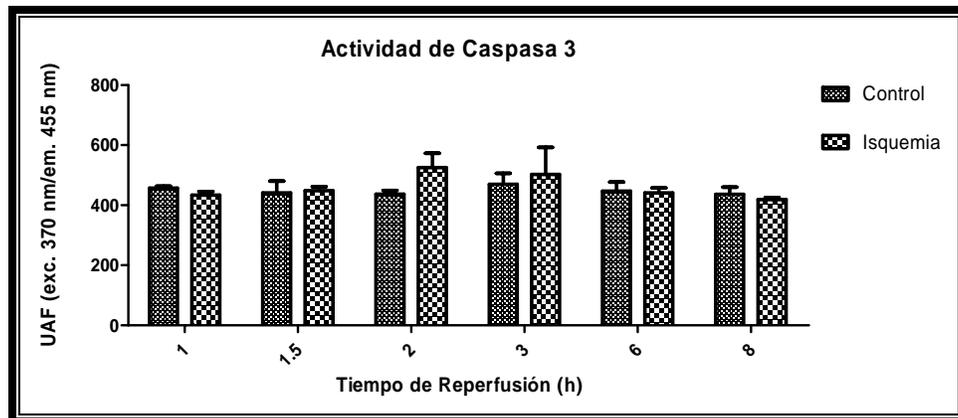


Figura 18. Efecto de 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos reperfusión sobre la actividad de la caspasa 3. Los valores se presentan como la media \pm DE (n=4 para cada grupo).

En el ensayo de actividad de caspasa 3 utilizando **0.5 y 1.5 h de isquemia** no se observaron diferencias entre los grupos de isquemia y sus controles y los

diferentes tiempos de reperfusión empleados. Esto puede deberse a que los períodos prolongados de isquemia (0.5 y 1.5 h) producen una intensa estimulación de los receptores NMDA, generando que la mayoría de las células mueran por necrosis y no a través de apoptosis mediada por caspasas. Malagelada y colaboradores (2005) empleando cultivos celulares sometidos a POG observaron que la muerte celular por necrosis o apoptosis depende de la duración e intensidad del estímulo, en este caso la POG. Además ha sido reportado que los receptores NMDA están involucrados en la muerte por necrosis o apoptosis dependiendo de la intensidad del estímulo. Así, un estímulo leve de los receptores NMDA induce apoptosis, mientras que un estímulo intenso produce principalmente muerte por necrosis (Bonfoco *et al.*, 1995).

Para confirmar los resultados de actividad de caspasa 3 se realizó también un ensayo de réplica en western utilizando un anticuerpo anti-caspasa 3. No se pudo eliminar el fondo para la detección de la caspasa 3, por lo que no se puede mostrar una imagen clara; sin embargo, en todos los casos se pudo observar la presencia del precursor inactivo, así como de los fragmentos de 17 y 11 kDa, indicando una activación parcial de la caspasa 3 sin diferencias notables entre los diferentes grupos. Estos resultados junto con los de la actividad de caspasa 3, confirman que la muerte neuronal de las rebanadas no está asociada al menos totalmente, con la apoptosis mediada por caspasas y que la actividad observada corresponde a una actividad basal.

6.4 DETECCIÓN DE ADP-ribosilación

Como en los ensayos de réplica en western y de actividad de caspasa 3 realizados en las rebanadas sometidas a isquemia/reperfusión no se observaron resultados que confirmaran muerte celular por apoptosis, se evaluó si era posible detectar un marcador del mecanismo de muerte neuronal por necrosis.

La poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) es una proteína de 113 kDa presente en el núcleo de la mayoría de los tipos celulares. La PARP-1 es activada por rupturas en la hebra de ADN, que pueden ser inducidas por una variedad de

estímulos ambientales y por el ataque de los radicales libres, tales como el H_2O_2 , el OH^\bullet y el ONOO^- . En respuesta al daño, la PARP-1 se une al ADN lesionado y cataliza la transferencia sucesiva de unidades de ADP-ribosa de su sustrato β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a una variedad de proteínas entre las que se encuentran histonas, topoisomerasa I y II, proteínas cinasas dependientes de ADN y PARP-1. La adición de polímeros de poli(ADP-ribosa) cargados negativamente a las proteínas nucleares altera drásticamente las cargas electrostáticas de esas proteínas y contribuye al complejo proceso involucrado en la reparación del ADN (Szabó *et al.*, 1998; Ha, 2000).

PARP-1 media la muerte celular necrótica porque depleta el ATP. La activación excesiva de la PARP puede agotar el almacén celular de NAD^+ y afectar principalmente las rutas metabólicas dependientes de NAD^+ tales como glucólisis y cadena respiratoria. Como consecuencia, la producción de ATP es reducida. Además, en un esfuerzo para resintetizar NAD^+ , la célula consume una cantidad significativa de ATP (4 moléculas de ATP para regenerar una molécula de NAD^+) de esta forma empeora la falla energética y contribuye a la generación de un círculo vicioso que conduce a la muerte celular (Meli *et al.*, 2003).

Para la detección de ADP-ribosilación se realizó una réplica en western. Se evaluó la detección de productos de ADP-ribosilación en rebanadas después de ser obtenidas en el vibratomo [(después del corte (DC), después de la preincubación (DP) y después de la recuperación (DR), ver métodos] sin ser sometidas a tiempos de isquemia o de reperfusión. En estos controles se observó claramente una señal de menor intensidad comparada con la obtenida al usar 0.5 o 1.5 h de isquemia (Figura 19).

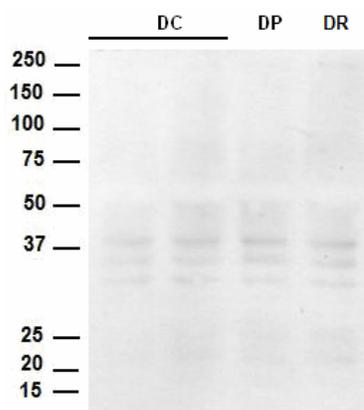


Figura 19. Detección de ADP-ribosilación en rebanadas control. DC, después del corte; DP, después de la preincubación y DR, después de la recuperación.

En el ensayo utilizando **0.5 y 1.5 h de isquemia**, se observó la presencia de productos de la ADP-ribosilación. Sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos de isquemia y sus controles y entre los diferentes tiempos de reperfusión. Se muestra sólo la réplica en western de las rebanadas sometidas a 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión (1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) (Figura 20). En el caso de 0.5 h de isquemia no se pudo eliminar el fondo para la detección de ADP-ribosilación, por lo que no se puede mostrar una imagen clara. Además la señal obtenida con 0.5 h de isquemia no fue tan intensa como la observada al someter a las rebanadas a 1.5 h de isquemia, sin embargo, en todos los casos pudimos observar la presencia de productos de ADP-ribosilación.

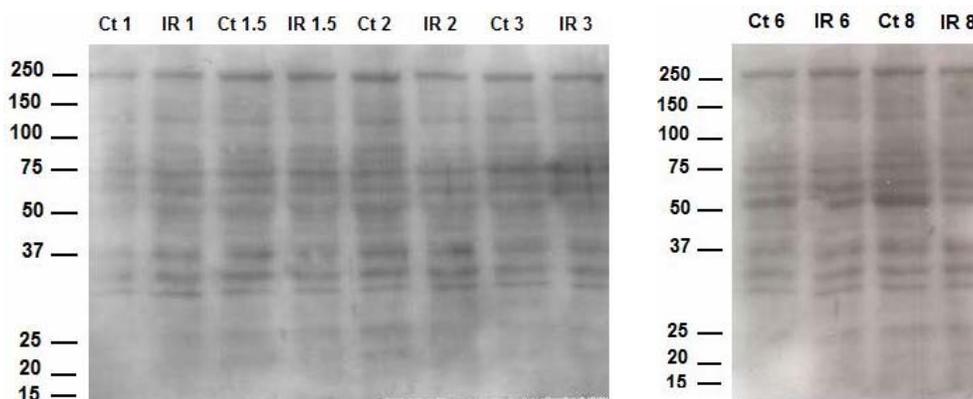


Figura 20. Detección de ADP-ribosilación en rebanadas sometidos a 1.5 h de isquemia.

Con estos resultados y los obtenidos en los ensayos de actividad y detección de caspasa 3 podemos concluir que el mecanismo de muerte celular en las rebanadas sometidas a isquemia/reperfusión es la necrosis. La muerte celular necrótica es consecuencia de la sobreactivación de los receptores NMDA y el subsecuente flujo de Ca^{2+} dentro de las células. Este aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} activa varias enzimas, entre las que se encuentran la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima produce NO^{\bullet} que reacciona con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y genera ONOO^- que puede causar rupturas en la hebra de ADN y en consecuencia provocar la activación de la PARP. Meli y colaboradores (2003) observaron una activación significativa de la PARP en cultivos neuronales expuestos a POG. Además demostraron que los inhibidores de la PARP previenen la activación de dicha enzima y la muerte neuronal. Sugiriendo que la PARP-1 está involucrada en el mecanismo que conduce a la muerte neuronal después de la isquemia cerebral.

En resumen, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que durante la isquemia se generan gran cantidad de radicales libres, los cuales pueden atacar rápidamente el sitio activo de varias enzimas entre ellas las antioxidantes. Se sabe que la isquemia/reperfusión altera la actividad de las enzimas antioxidantes y esta disminución en la actividad puede ser explicada debido al ataque del sitio activo de las enzimas por los radicales libres de oxígeno y la interacción de las enzimas con productos de peroxidación. Otra razón para la reducción de la actividad enzimática puede ser atribuida a la reducción del pH, por ejemplo durante la acidosis. La isquemia hace que las células se sometan a un metabolismo anaerobio donde hay producción de ácido láctico y acidosis (Naga *et al.*, 2007).

Los tiempos de isquemia utilizados (0.5 y 1.5 h) generan un estímulo intenso, muy probablemente sobre los receptores NMDA que provocan que el mecanismo de muerte celular sea la necrosis. Se ha demostrado que la intensidad en la estimulación de los receptores NMDA está implicada en el tipo de muerte celular observada después de un período de isquemia/reperfusión (Malagelada *et al.*, 2005).

VII. CONCLUSIONES

- Las condiciones de obtención, incubación y generación de isquemia y reperfusión *in vitro* nos permitieron obtener resultados reproducibles en la determinación de la viabilidad celular, actividad de enzimas y actividad de caspasas.
- Con los resultados obtenidos con dos diferentes tiempos de isquemia (0.5 y 1.5 h) se observó que el aumento en el tiempo de isquemia generó alrededor de un 20 % más de daño en las rebanadas sometidas a isquemia/reperfusión.
- La actividad de catalasa en las rebanadas con 0.5 h de isquemia sólo mostró diferencias significativas después de 2 y 3 h de reperfusión, en los que se observó un aumento en la actividad con respecto al grupo con 1 h de reperfusión. Utilizando 1.5 h de isquemia se observó una ligera disminución en la actividad que es estadísticamente significativa sólo después de 6 h de reperfusión.
- La actividad de GPx en las rebanadas con 0.5 h de isquemia muestra una disminución estadísticamente significativa a partir de 1.5 h de reperfusión con respecto al grupo con 1 h de reperfusión y hasta las 8 h evaluadas. Esta disminución significativa se observa también cuando las rebanadas se someten a 1.5 h de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión.
- La actividad de SOD en las rebanadas con 0.5 h de isquemia muestra una disminución estadísticamente significativa a partir de 2 h de reperfusión con respecto al grupo con 1 h de reperfusión y hasta las 8 h evaluadas. No se observaron diferencias en la actividad de SOD en las rebanadas con 1.5 h de isquemia a los diferentes tiempos de reperfusión.
- Los resultados de actividad de caspasa 3 y de detección de ADP-ribosilación por réplica en western sugieren que el principal mecanismo de muerte neuronal en las rebanadas sometidas a 0.5 y 1.5 h de isquemia a los diferentes tiempos de reperfusión es la necrosis.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams R, Victor M, Ropper A. 1999. Principios de Neurología. McGraw-Hill Interamericana Ed. México: 674
- Aebi H. 1984 Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-126
- Aguilar OR, Alegría MA, Salazar A. 2005. Enfermedad vascular cerebral en un hospital de tercer nivel: estudio descriptivo. *Rev Neurol Neurocir Psiquiat* 38:135-139
- Aguilera P, Chánez-Cárdenas ME and Maldonado PD. “Recent advances in the use of antioxidant treatments in cerebral ischemia” (2007) In: “New perspectives on brain cell damage neurodegeneration and neuroprotective strategies”. Santamaría A, ME Jiménez, S.G. Pandalai (Editors). Research Signpost, Kerala, India. (ISBN:81-308-0164-7) 61-74
- Bano D, Nicotera P. 2007. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 38:674-676
- Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240:500-508
- Bonde C, Norberg J, Noer H, Zimmer J. 2005. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136:779-794
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced respectively by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7162–7166.

- Bramlett HM, Dietrich WD. 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:133–150
- Camacho A, Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37:11-18
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173
- Chaves F. 2000. Accidente vascular cerebral: ¿Es el accidente vascular cerebral una enfermedad tratable?. *Rev Costarric Cardiol* 2:27-33
- Choi SH, Kim DW, Kim SY, An JJ, Lee SH, Choi HS, Sohn EJ, Hwang S, Won MH, Kang TC, Kwon HJ, Kang JH, Cho SW, Park J, Eum WS, Choi SY. 2005. Transduced human copper chaperone for Cu,Zn-SOD (PEP-1-CCS) protects against neuronal cell death. *Mol Cells* 20:401-408
- Crack PJ, Taylor JM. 2005. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 38:1433-1444
- Danielisová V, Némethová M, Gottlieb M, Burda J. 2005. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res* 30:559-565
- De La Cruz JP, Guerrero A, González-Correa JA, Arrebola MM, De la Cuesta SF. 2004. Antioxidant effect of acetylsalicylic and salicylic acid in rat brain slices subjected to hypoxia. *J Neurosci Res* 75:280-90

- Dennerly PA. 2000. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* 36:181-199
- Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. 2001. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol* 33:455-64
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397
- Dirnagl U, Lindauer U, Schreiber S, Pfister HW, Koedel U, Reszka R, Freyer D, Villringer A. 1995. Global cerebral ischemia in the rat: online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:929-940
- Drgová A, Likavcanová K, Dobrota D. 2004. Changes of phospholipid composition and superoxide dismutase activity during global brain ischemia and reperfusion in rats. *Gen Physiol Biophys* 23:337-46
- Durukan A, Tatlisumak T. 2007. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179-197
- Fekete A, Vizi ES, Kovács KJ, Lendvai B, Zelles T. 2008. Layer-specific differences in reactive oxygen species levels after oxygen-glucose deprivation in acute hippocampal slices. *Free Radic Biol Med* 44:1010-1022
- Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Casanova I, Bonet B, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. 2005. Immature rat brain slices exposed

- to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neurosci Methods* 145:205-12
- Fukuhara R, Kageyama T. 2005. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141:428 - 436
 - Gárate-Salazar A, Valencia-Chávez A, Villagaray E, Romero R, Gárate-Arias S. 2002. Enfermedad cerebrovascular isquémica. Propuesta de protocolo de manejo. *Rev Per Neurol* 8:16-23
 - Gundersen V, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 2001. Redistribution of neuroactive amino acids in hippocampus and striatum during hypoglycemia: a quantitative immunogold study. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:41-51
 - Ha HC, Snyder SH. 2000. Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 in the Nervous System. *Neurobiol of Dis* 7:225-239
 - Haces del Blanco ML, Massieu-Trigo L. 2005. Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Arch Neurocién* 10:83-91
 - Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312-322
 - Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico XXVI:19-54
 - Homi HM, Freitas JJS, Curi R, Velasco IT y Junior BAS. 2002. Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. *Neurosci Lett* 333:37-40

- Hossmann KA. 2008. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* XX:1-14
- Hunter AJ, Green AR, Cross AJ. 1995. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs?. *Trends Pharmacol Sci* 16:123-128
- İşlekel S, İşlekel H, Güner G, Ozdamar N. 1999. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Res Exp Med (Berl)* 199:167-76
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22:100-106
- Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. 2002. Production and role of superoxide radicals after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction. *Stroke* 33:809-815
- Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:248-254
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958
- Leker RR, Shohamib E. 2002. Cerebral ischemia and trauma different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev* 39:55–73

- Lerouet D, Beray-Berthaut V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. 2002. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 958:166–175
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1432-1568
- López F, Hernández-Palazón J, López R, Alarcón E, Martínez-Lage JF. 2004. Activity of copper-zinc superoxide dismutase in a global ischemic brain lesion model without arterial hypotension. *Neurocirugía* 15:151-8
- Lledías F, Hansberg W. 2000. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol* 319:110-119
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265-275
- Mac Millan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37:1613-1622
- Malagelada C, Xifró X, Miñano A, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J. 2005. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen–glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20:27-37
- Maldonado P, Aguilera P, Barrón-Ortega A, García de la Cadena-Farfán S and Chánez-Cárdenas ME. “The role of superoxide dismutase in cerebral ischemia damage” (2008) En: “Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications”. Díaz-Muñoz M, Santamaría A, S.G. Pandalai (Editors). Research Signpost, Kerala, India (Aceptado, Diciembre 2007).

- Margail I, Plotkine M, Lerouet D. 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39:429 – 443
- Massieu L. 1999. Muerte por isquemia y anoxia. En: *Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares*. Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R (Eds). Fondo de Cultura Económica. México. 81-94
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603
- Mathews KS, McLaughlin DP, Ziabari LH, Toner CC, Street PC, Hisgrove E, Bezzina EL, Stamford JA. 2000. Rapid quantification of ischaemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *J Neurosci Methods* 102:43-51
- Meier B, Scherk C, Schmidt M, Parak F. 1998. pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochem J* 331:403-407
- Meli E, Pangallo M, Baronti R, Chiarugi A, Cozzi A, Pellegrini-Giampietro DE, Moroni F. 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase as a key player in excitotoxicity and post-ischemic brain damage. *Toxicol Lett* 139:153-162
- Mukherjee PK, Nazeer KFH, Kumar V, Mukherjee K, Houghton PJ. 2007. Protective effect of biflavones from *Araucaria bidwillii* Hook in rat cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress. *Behav Brain Res* 178:221-228

- Naga KK, Panigrahi M, Babu PP. 2007. Changes in endogenous antioxidant enzymes during cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol Res* 29:877-883
- Neumar RW. 2000. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 36:483-506
- Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Magrean AM, Magrean L. 2001. Oxidative damage following ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med* 5:163-170
- Nordberg J, Arnér ESJ. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31:1287-1312
- Nozik-Grayck E, Suliman HB, Pia CA. 2005. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2466-2471
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105:457-464
- Olney JW. 1994. Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol of Aging* 15: 259-260
- Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 349:1-6
- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205

- Planas AM. 1997. Alteraciones de la membrana celular y de la síntesis de proteínas en modelos experimentales de isquemia cerebral: implicaciones farmacológicas para el tratamiento de la patología isquémica. *Rev. Neurol* 12:405-417
- Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM. 2003. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134:281-289
- Preston E, Webster J. 2000. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. *J Neurosci Methods* 94:187-192
- Ramírez Haro RJ. Ventana terapéutica del extracto de ajo envejecido en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria en ratas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM 2007
- Ramírez JA, González R. 2007. Enfermedad cerebrovascular, epidemiología y prevención. *Rev Fac Med UNAM* 50:36-39
- Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36:1-9
- Ruiz-Sandoval JL, González-García CK, García-Navarro V, Gutiérrez-Manjarrez FA, González-Cornejo S. 2003. Enfermedad vascular cerebral isquémica en dos hospitales mexicanos. *Rev Mex Neuroci* 4:319-323
- Schaller B, Graf R. 2004. Cerebral Ischemia and Reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:351-371

- Szabó C, Dawson VL. 1998. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia–reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 19:287-298
- Shi Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459-470
- Small DL, Buchan AM. 2000. Animal models. *Br Med Bull* 56:307-31
- Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. 2002. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem* 277:41254-41258
- Traystman RJ. 2003. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR Journal* 44:85-95
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84
- Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207:3221-3231
- Xue QS, Yu BW, Wang ZJ, Chen HZ. 2004. Effects of ketamine, midazolam, thiopental, and propofol on brain ischemia injury in rat cerebral cortical slices. *Acta Pharmacol Sin* 25:115-20
- Yoon DE, Yoo KY, Hwang IK, Lee JJ, Kim JH, Kang TC, Won MH. 2006. Comparative study on Cu,Zn-SOD immunoreactivity and protein levels in the adult and aged hippocampal CA1 region after ischemia-reperfusion *Brain Res* 1092:214-219

- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162