



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR  
Y DAÑO OXIDATIVO POR ISQUEMIA Y  
REPERFUSIÓN EN REBANADAS  
CORTICOESTRIATALES DE RATA

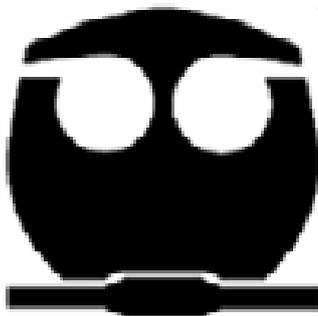
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

ARACELI BARRÓN ORTEGA



MÉXICO D.F

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. Homero Hernández Montes.  
VOCAL: Prof. Sobeida Sanchez Nieto.  
SECRETARIO: Prof. Ma. Elena Chánez Cárdenas.  
1er. SUPLENTE: Prof. Criselda Mendoza Milla.  
2º. SUPLENTE: Prof. Eleazar Martinez Barajas.

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

La alumna Araceli Barrón Ortega fue beneficiaria de una beca de pregrado otorgada por la fundación Armstrong.

## **ASESOR DEL TEMA**

---

Dra. Ma. Elena Chánez Cárdenas.

## **SUPERVISOR TÉCNICO**

---

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez.

## **SUSTENTANTE**

---

Araceli Barrón Ortega

## AGRADECIMIENTOS

Gracias de todo corazón a mis papás por su amor, confianza y comprensión. Reconozco el enorme e incondicional esfuerzo que han realizado ambos para que yo pudiera dedicarme exclusivamente a estudiar. Me siento realmente afortunada de tenerlos como padres, son mi ejemplo y mi guía.

Ma. Elena, muchísimas gracias por todas tus enseñanzas y la energía invertida en este proyecto, pero sobre todo por tu amistad y buenos consejos. Gracias Perla y Penélope por sus valiosas opiniones y atribuciones en este trabajo. A mis compañeros de laboratorio: Raúl, Selene, Adriana, Ran y Daniel, gracias por compartir más que trabajo y por haber estado siempre dispuestos a ayudarme. A la Sra. Tere por soportar mi salpicadero y brindarme su amistad. Gracias a todos por tantos buenos momentos.

Nieves, Adriana, Karina, Sonia, Sofía, Jane, Lilián, Toño, Fidel, Yunuen, Yessica, Ximena... gracias por hacerme tan ameno el tiempo en la escuela, definitivamente no hubiera sido lo mismo sin ustedes, gracias por su ayuda incondicional y por todas las veces en que fueron mis guías.

A Nay, Marijo, Alma, Ana, Pris, Erika, Diana, Itzel por su confianza y lealtad por y los sueños que hemos y seguiremos compartiendo.

Gracias al maestro Homero Hernández Montes y a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por sus valiosas correcciones a este trabajo.

A mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y su amor por la carrera.

A la UNAM que se convirtió en mi segunda casa.

Gracias a Dios por llenar mi vida de bendiciones!!!

PARA MIS PAPÁS

Rosario y Raúl

---

<b>1- Resumen.</b>	1
<b>2- Introducción.</b>	3
2.1 Enfermedad cerebral vascular: Epidemiología y tipos	3
2.2 Isquemia	4
2.3 Reperusión	6
2.4 Fisiopatología de la isquemia reperusión	6
2.4.1 Falla energética	6
2.4.2 Excitotoxicidad	8
2.4.3 Incremento de Ca <sup>2+</sup> libre intracelular	10
2.4.4 Estrés Oxidativo	12
2.4.4.1 Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno	12
2.4.4.2 Incremento de ER durante la isquemia y la reperusión	13
2.4.4.3 Daño oxidativo	13
2.4.4.4 Defensas antioxidantes	16
2.4.5 Inflamación	20
2.4.6 Apoptosis	20
2.5 Modelos de isquemia	21
2.6 Rebanadas cerebrales	23
<b>3- Justificación.</b>	25
<b>4- Objetivos.</b>	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares	26
<b>5- Metodología.</b>	27
5.1 Animales	27
5.2 Obtención de las rebanadas cerebrales	27
5.3 Modelo de Isquemia – Reperusión <i>in vitro</i>	29
5.3.1 Preincubación	29
5.3.2 Recuperación	30
5.3.3 Isquemia	30
5.3.4 Reperusión	30
5.4 Evaluación de la viabilidad celular	31
5.4.1 Tinción con TTC	31
5.4.2 Extracción de formazán	31
5.5 Determinación de daño oxidativo	32
5.5.1 Niveles de glutatión reducido	32
5.5.2 Niveles de lipoperoxidación	33
5.6 Actividad de enzimas antioxidantes	34
5.6.1 Homogenización de las rebanadas	34
5.6.2 Cuantificación de las proteínas	34

---

5.6.3 Actividad de la Catalasa (CAT)	36
5.6.4 Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD)	36
5.6.5 Actividad de la Glutación peroxidasa (GPx)	38
5.7 Análisis estadístico	40
<b>6- Resultados y Discusión</b>	<b>41</b>
6.1 Elección del procedimiento para la inducción de la isquemia y la reperfusión	41
6.2 Determinación de la viabilidad celular a diferentes tiempos de isquemia y reperfusión	44
6.3 Evaluación de daño oxidativo	46
6.3.1 Niveles de glutación reducido	47
6.3.2 Niveles de lípoperoxidación	48
6.4 Actividad de las enzimas antioxidantes	51
6.4.1 Actividad de la Superóxido dismutasa	51
6.4.2 Actividad de la Catalasa	53
6.4.3 Actividad de la Glutación peroxidasa	55
<b>7- Conclusiones</b>	<b>56</b>
<b>8- Referencias</b>	<b>57</b>
<b>9- Abreviaturas</b>	<b>66</b>

## 1. RESUMEN:

Una de las principales causas de muerte y discapacidad en nuestro país son las enfermedades cerebrovasculares, especialmente la isquemia cerebral. El daño cerebral por isquemia es el resultado de una reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo y por tanto de oxígeno y glucosa a un área del cerebro. Esto desata una cascada de eventos iónicos y metabólicos que llevan a la activación de múltiples señales de transducción que resultan en disfunción neuronal y muerte celular. La severidad del daño está determinada por el grado y duración de la interrupción del flujo sanguíneo, el daño aumenta si el paciente permanece sin un tratamiento adecuado.

Entre los mecanismos patológicos principales de la isquemia cerebral se encuentra el daño por el estrés oxidativo. Éste es provocado por la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno debido a la falta de ATP y al incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, durante la isquemia. El restablecimiento del flujo sanguíneo, llamado también reperfusión, incrementa el estrés oxidativo debido principalmente a que durante la isquemia se genera un ambiente reductor por la falta de aceptor final de electrones. Al reintroducirse el  $\text{O}_2$  se producen grandes cantidades de especies reactivas, superando los mecanismos de captura. Por todo esto, el estrés oxidativo constituye actualmente uno de los principales blancos para la neuroprotección.

Los modelos experimentales son una herramienta indispensable en el campo de investigación de la isquemia cerebral, tanto para investigar los mecanismos del daño isquémico como para desarrollar nuevas estrategias que minimicen sus repercusiones. En la últimas décadas se han desarrollado modelos de daño en rebanadas cerebrales, que aparentemente ofrecen muchas ventajas sobre los modelos *in vivo*, principalmente por requerir menor tiempo para generar el daño isquémico y porque se tiene un acceso inmediato al compartimiento extracelular en el tejido cerebral al no existir la barrera hematoencefálica.

Por las ventajas que ofrece el modelo de isquemia y reperfusión en rebanadas cerebrales, puede utilizarse como herramienta para evaluar el efecto de fármacos antioxidantes con posible actividad neuroprotectora. Sin embargo, las condiciones utilizadas para la obtención e incubación de rebanadas en estudios previos de isquemia y reperfusión en el modelo de rebanadas cerebrales son muy variables.

Es por eso que en este trabajo, se determinaron condiciones reproducibles para la obtención y la inducción *in vitro* de isquemia y reperfusión en rebanadas cerebrales, con el fin de obtener información acerca del daño oxidativo generado en este modelo y sobre qué elementos antioxidantes se ven afectados. Sobre el modelo establecido, se determinó la viabilidad celular, el daño oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

## 2- INTRODUCCIÓN

### 2.1 Enfermedad Vascul ar Cerebral: Epidemiología y tipos:

El término Enfermedad Vascul ar Cerebral (EVC) se refiere a toda anomalía funcional del sistema nervioso central, causada por la interferencia en el aporte normal de sangre al cerebro<sup>1-3</sup>.

En las últimas décadas la EVC ha sido identificada como la tercera causa de mortalidad en la población mundial<sup>1, 2, 4-8</sup>, incluyendo México<sup>6, 9-12</sup>. Además constituye la primera causa de discapacidad en los países desarrollados<sup>8, 13</sup> y la segunda causa de demencia después de la enfermedad de Alzheimer<sup>5-6</sup>. Debido a que el riesgo de sufrir EVC aumenta exponencialmente con la edad, se espera que su incidencia aumente conforme la población va envejeciendo. La EVC tiene un gran impacto económico ya sea por costos directos en cuidado para la salud como en costos indirectos por la pérdida de productividad<sup>7,14</sup> ya que los sobrevivientes presentan diversos grados de incapacidad que difícilmente les permiten reasumir su vida normal. Por todo esto la EVC representa una gran carga moral y económica y es actualmente una de las enfermedades más desafiantes.

Según su naturaleza, la EVC se puede presentar como isquémica o como hemorrágica, con una proporción en torno al 85 y 15%, respectivamente<sup>2,3</sup>. La EVC isquémica tiene su origen en la oclusión por un trombo o un émbolo de alguna de las principales arterias cerebrales. Otras causas de isquemia cerebral son el paro cardíaco y la hipotensión sistémica, que originan el descenso del aporte sanguíneo al cerebro en su totalidad. La EVC hemorrágica se genera por la ruptura de una arteria o vaso sanguíneo bien sea en el parénquima (“hemorragia intracerebral”) o en la superficie cerebral (“hemorragia subaracnoidea”). En este trabajo nos enfocamos a la EVC isquémica.

## 2.2 Isquemia

La isquemia cerebral es la reducción temporal o permanente, parcial o total del flujo sanguíneo cerebral hasta un nivel que resulta insuficiente para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales. Se conoce que durante la isquemia sólo se mantiene el 35% del flujo cerebral normal <sup>15</sup>. Esto resulta en una falla energética que da inicio a una compleja serie de eventos metabólicos que llevan a la muerte neuronal.

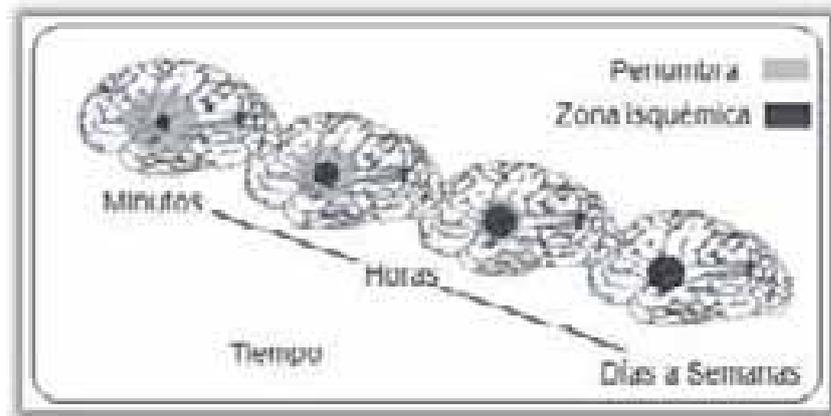
Hay principalmente dos tipos de isquemia cerebral<sup>2,3,7,15</sup>.

### a) Isquemia cerebral focal y aguda:

Se produce por la oclusión *in situ* de una arteria (trombosis), de estenosis arterial o de una embolia. El daño se restringe a un área de infarto en aquellas regiones suplementadas por el vaso ocluido y no se da de forma homogénea.

En la región isquémica central, *core* o área de infarto se mantiene un flujo sanguíneo del 20% de lo normal por lo que se agotan las reservas energéticas. Las células se despolarizan permanentemente y mueren rápidamente por lipólisis, proteólisis y desagregación de microtúbulos.

Alrededor del área de infarto o *core* existe un área conocida como penumbra isquémica. En ésta, la perfusión sanguínea se mantiene en un 20 a 50% de lo normal. Las células ahí localizadas se despolarizan constantemente, disminuyen su metabolismo pero son potencialmente rescatables ya que conservan su estructura <sup>16-18</sup>. La penumbra tiende a evolucionar a área de infarto si el deterioro del flujo sanguíneo cerebral persiste (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Si no hay un tratamiento adecuado y la reducción en el flujo sanguíneo cerebral persiste, la penumbra evoluciona a zona isquémica o core donde el daño es irreversible. Tomado y modificado de *Dirmagl et al*<sup>17</sup>.

### **b) Isquemia cerebral difusa y retardada:**

También conocida como isquemia global; es el descenso de flujo sanguíneo a la totalidad del cerebro. Ocurre como consecuencia de un paro cardíaco o hipotensión. El daño resultante en este tipo de isquemia es difuso y afecta a las neuronas que están en regiones más susceptibles al daño, como son el hipocampo, el estriado y la corteza. El daño no ocurre de manera inmediata sino que tarda algunos días para desarrollarse<sup>15</sup>.

El cerebro es muy susceptible al daño por isquemia ya que tiene un alto consumo de oxígeno y glucosa. A pesar de representar el 2% del peso total del cuerpo, recibe el 15% del flujo cardíaco y utiliza el 20% del oxígeno que consume el cuerpo<sup>2,18</sup>. La glucosa y el oxígeno los utiliza para generar energía en forma de ATP por medio de la fosforilación oxidativa en la mitocondria<sup>7,17</sup>. Además, la capacidad de almacenamiento de glucosa y glucógeno del cerebro es limitada. De hecho esta reserva es capaz de cubrir los requerimientos energéticos cerebrales durante solamente un minuto<sup>2,19</sup>.

### **2.3 Reperusión:**

Se le llama reperusión al restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral. La reperusión añade efectos deletéreos al daño causado por isquemia debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), a la acumulación de leucocitos que interaccionan con el endotelio y al aumento de la respuesta inflamatoria local con producción de citocinas<sup>16,20</sup>. Estos procesos se explicarán más adelante (ver secciones 2.4.4 y 2.4.6).

### **2.4 Fisiopatología de la isquemia reperusión:**

El avance en el tratamiento de la isquemia cerebral humana se debe al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, es decir a conocer todos los mecanismos implicados en el daño neuronal y muerte.

El proceso isquémico es sumamente complejo, con un gran número de interacciones<sup>21</sup>, el nivel de daño depende de la duración y el grado de la isquemia y el tiempo en el que se restablece el flujo sanguíneo.

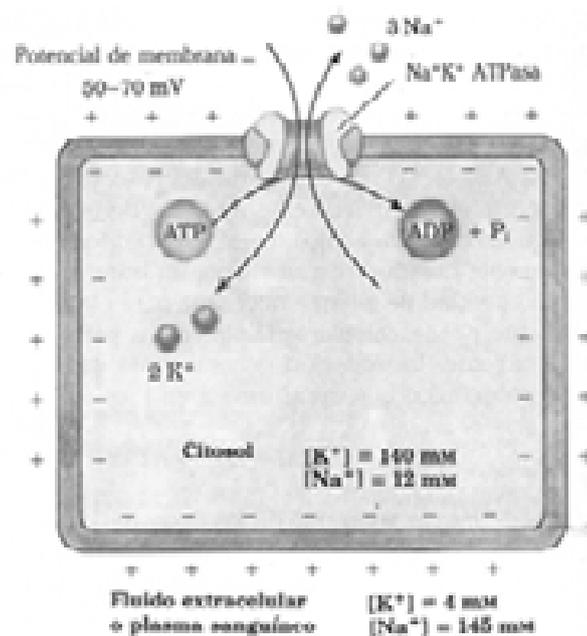
Los principales mecanismos patológicos involucrados en el daño por isquemia y reperusión son: Falla energética, la excitotoxicidad, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular, el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis que se explican a continuación.

#### **2.4.1 Falla energética:**

La disminución de flujo sanguíneo al cerebro, restringe la llegada de sustratos, principalmente oxígeno y glucosa, por lo que la síntesis de ATP en la mitocondria se detiene<sup>17,22</sup>. En esas condiciones la célula depende de la glucólisis anaeróbica y de los depósitos de glucógeno para obtener ATP, pero éstos son muy limitados. Como consecuencia todos los componentes del sistema de transporte de electrones mitocondrial se saturan con electrones ya

que no hay  $O_2$  que es su aceptor final y se acumulan NADH y lactato provocando acidosis<sup>14</sup>.

Al detenerse la síntesis de ATP el funcionamiento la  $Na^+/K^+ATPasa$  (Fig 2.2), entre otras bombas iónicas de la membrana se hace deficiente, por lo que el gradiente iónico desaparece, acumulándose iones  $K^+$  en el medio extracelular, y iones  $Na^+$  en el interior de las células, por lo tanto éstas se despolarizan<sup>14-18,23</sup>.



**Figura 2.2.** La  $Na^+/K^+ATPasa$  es responsable mayoritariamente de fijar y mantener las concentraciones intracelulares de  $Na^+$  y  $K^+$  y de generar el potencial eléctrico transmembranal, al sacar tres iones  $Na^+$  de la célula por cada dos iones  $K^+$  que entran. Debido a la falta de ATP durante la isquemia la  $Na^+/K^+ATPasa$  no funciona y se pierde el potencial eléctrico transmembranal, es decir la célula se despolariza. Tomado de *Lehninger et al*<sup>19</sup>.

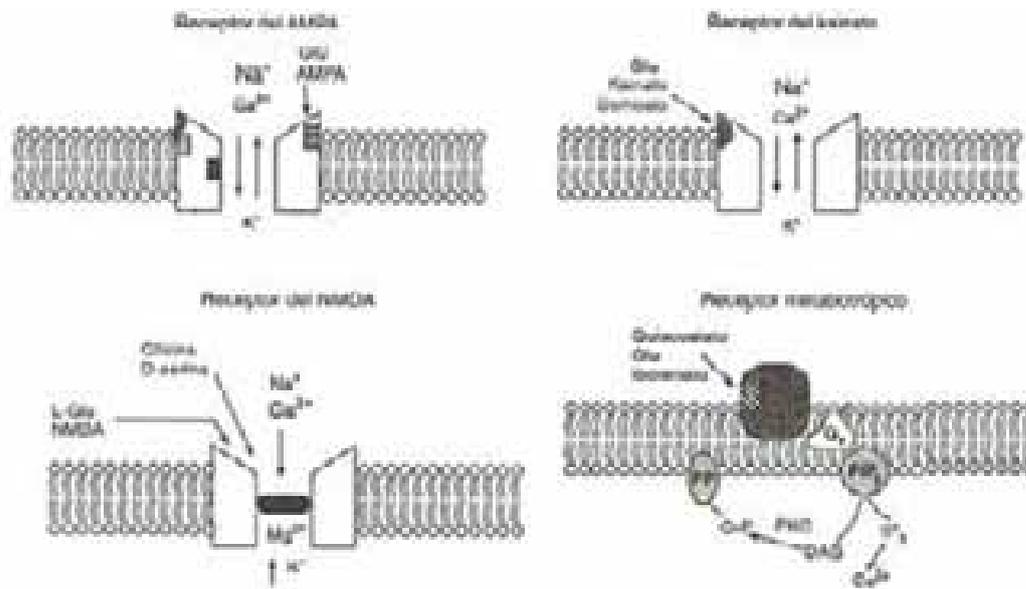
La despolarización provoca la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, que se abren dejando entrar  $Ca^{2+}$  a la célula<sup>13,18,24</sup>, lo cual tiene graves consecuencias (Ver sección 2.4.3). Por la falta de ATP también fallan muchos procesos biosintéticos dependientes de ATP<sup>14</sup>. Esto afecta especialmente al

metabolismo de las proteínas, cuya degradación y síntesis parecen estar suspendidas durante y después del episodio isquémico<sup>25-26</sup>.

#### **2.4.2 Excitotoxicidad:**

El término excitotoxicidad se refiere a la capacidad de los aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato, de destruir a las células nerviosas. Es un fenómeno global que inicia con la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos y continúa con una serie de reacciones metabólicas que conllevan a la destrucción neuronal<sup>15,27</sup>. Los receptores de glutamato se clasifican en: 1) Receptores ionotrópicos, los cuales están acoplados a canales iónicos que se abren al ser fijado el neurotransmisor, como los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), KA (kainato) y AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metililoxazol-4-propiónico) (ver Figura 2.3) y 2) Receptores metabotrópicos, que están acoplados a proteínas G y al activarse, desatan distintas vías de señalización intracelular (ver Figura 2.3).

La excitotoxicidad es uno de los primeros eventos de la cascada isquémica. La despolarización celular aunada a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje provoca la liberación de glutamato y aspartato de las neuronas<sup>23,28</sup>. Su recaptura no es posible debido a la falta de energía<sup>17</sup> y al funcionamiento inverso de los transportadores de glutamato, por lo que se acumula en el espacio extracelular y se genera una sobreactivación de sus receptores. La despolarización también favorece la activación de los receptores NMDA al desplazar un ión  $\text{Mg}^{2+}$  que se encuentra bloqueándolos<sup>18</sup> (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Receptores de Glutamato:** Existen dos tipos de receptores para el glutamato: 1) Receptores ionotrópicos que son canales iónicos que se abren al ser fijado el neurotransmisor. Estos se denominan de acuerdo a su agonista farmacológico y los principales son los receptores kainato (KA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). Son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . 2) Receptores metabotrópicos. Están acoplados a proteínas G a través de las cuales pueden, por una lado activar la fosfolipasa C para producir los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), o por otro lado, inhibir a la adenilato ciclasa, y por tanto suspender la síntesis del AMP cíclico. La figura muestra los diferentes sitios de unión para cada receptor así como sus principales agonistas. Tomado de *Massieu 1999*<sup>15</sup>.

La excitotoxicidad provoca eventos patológicos importantes como son:

❖ **Edema:**

La entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula por medio de receptores ionotrópicos, principalmente receptores AMPA y KA, provoca la entrada pasiva de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  provocando edema, lo cual afecta el flujo sanguíneo a las regiones que rodean el centro de la lesión y ésta aumenta<sup>15, 17, 23, 28, 29</sup>.

❖ **Aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular:**

El  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular aumenta debido a: 1) la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través de receptores ionotrópicos, principalmente NMDA, y 2) la activación de receptores metabotrópicos provocando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (Figura 2.4). Esto tiene gran efecto en el desarrollo del daño al tejido<sup>15-16, 22, 28-31</sup> (ver sección 2.4.3).

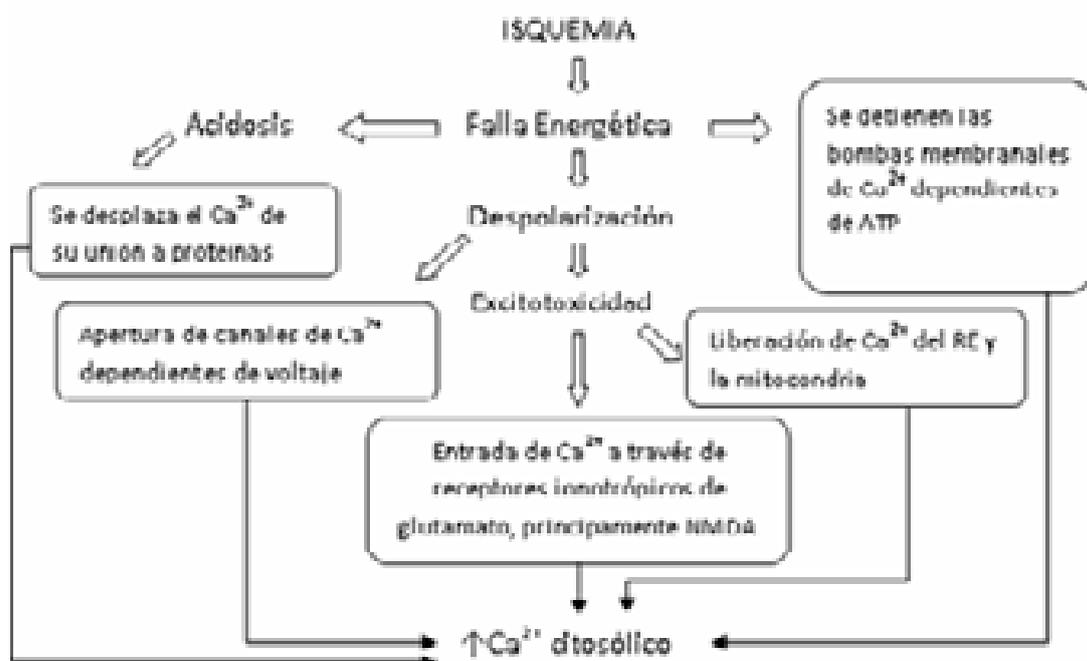
❖ **Despolarizaciones Perinfarto:**

La acumulación de glutamato y aspartato en el medio extracelular genera una onda de despolarización prolongada llamada despolarizaciones perinfarto. En la zona de penumbra las células pueden repolarizarse a expensas de un alto consumo de energía, pero se despolarizan nuevamente debido a que los niveles de glutamato y  $K^+$  extracelular siguen altos, disminuyendo la posibilidad de que este tejido sobreviva<sup>15, 17, 23, 29</sup>.

### 2.4.3 Incremento de $Ca^{2+}$ libre intracelular:

En una célula sana la concentración de  $Ca^{2+}$  libre intracelular es muy baja ( $<10^{-7}$  M)<sup>19</sup>. Existen sistemas reguladores muy finos para evitar que no se modifique: Es eliminado del citosol por las bombas de  $Ca^{2+}$  dependientes de ATP, se encuentra unido a proteínas tampón y es confinado en el retículo endoplásmico (RE) o en las mitocondrias<sup>14,18</sup>.

Como se ha mencionado, son muchos los factores que durante la isquemia, aumentan el  $Ca^{2+}$  libre intracelular<sup>29</sup> (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Factores que incrementan el  $Ca^{2+}$  libre intracelular durante la isquemia

Este incremento juega un papel muy importante en el daño por isquemia debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$ :

- Activa enzimas proteolíticas que degradan proteínas del citoesqueleto (actina y espectrina) y proteínas de la matriz extracelular (laminina)<sup>17-18</sup>.
  
- Activa fosfolipasas, como la fosfolipasa A2, lo que resulta en la liberación de grandes cantidades de ácidos grasos libres como el ácido araquidónico de la membrana de los fosfolípidos<sup>16-18</sup>; produciendo lesión en las membranas citoplasmática, mitocondrial y lisosomal. Activa también a la fosfolipasa C que hidroliza fosfolípidos liberando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El DAG activa a la proteína cinasa C lo que conduce a la transferencia de grupos fosfato del ATP a varias proteínas citosólicas, alterando de ese modo su actividad. El  $\text{IP}_3$  produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los compartimentos intracelulares aumentando el daño por  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>19, 28</sup>.
  
- Activa a la Ciclooxygenasa, que metaboliza el ácido araquidónico generando radicales libres que saturan los mecanismos de defensa endógenos; produciendo peroxidación de lípidos y daño a la membrana. Los radicales libres son también moléculas de señalización que desencadenan inflamación y apoptosis<sup>17, 23</sup> (ver sección 2.4.4).
  
- Activa a la enzima sintasa del óxido nítrico (NO) dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El NO formado reacciona con el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), una especie altamente reactiva que promueve el daño al tejido por daño directo a las proteínas, a los lípidos de la membrana y al ADN<sup>16-17, 23, 30-33</sup>.

## 2.4.4 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es un desbalance entre la generación de especies oxidantes y el sistema antioxidante de la célula, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro en las funciones celulares o incluso muerte celular (ver sección 2.4.4.4). Se origina como consecuencia de la disminución en las defensas antioxidantes (ver sección 2.4.4.3), del incremento en la producción de radicales libres (ver sección 2.4.4.1) o de ambos.

### 2.4.4.1 Especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno:

En términos de estrés oxidativo se llama especies reactivas (ER) a moléculas altamente inestables y oxidantes que reaccionan rápidamente con componentes celulares produciendo daño. Las ER pueden ser radicales libres, es decir que contienen un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les da una alta inestabilidad química; o bien ser compuestos que tienen la capacidad de convertirse o generar radicales libres (pro-radicales). Las ER más importantes a nivel celular son las derivadas del oxígeno (ERO) y las de nitrógeno (ERN), las principales se muestran en la tabla 2.1.

Especies Reactivas de Oxígeno	
Radicales Libres	Pro-Radicales
Superóxido $O_2^{\cdot-}$ Radical Hidroxilo $OH\cdot$	Peróxido de Hidrógeno $H_2O_2$ Oxígeno Singulete $1O_2$ Ácido Hipocloroso $HOCl$
Especies Reactivas de Nitrógeno	
Radicales libres	Pro-Radicales
Óxido Nítrico $NO\cdot$ Dióxido de nitrógeno $\cdot NO_2$	Peroxinitrito $ONOO^-$ Nitrito $NO_2^-$

**Tabla 2.1** Principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

---

Dentro de la célula existen muchos sitios de formación de ER. La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sitio de formación de ERO seguido de los peroxisomas y el citosol. Las ERO son indispensables entre otras cosas en la regulación metabólica y la defensa inmunológica. Las ERN se producen principalmente a través de reacciones metabólicas en el citosol y son indispensables en el proceso de contracción del músculo liso en el endotelio vascular y actualmente se ha demostrado que están implicadas en la regulación metabólica de las neuronas<sup>8, 34, 35</sup>.

#### 2.4.4.2 Incremento de ER durante la Isquemia y la Reperfusión

Durante la isquemia se producen ER de una forma descontrolada debido a la falta de ATP y al incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico<sup>22, 31, 36</sup>. Esta producción de ER se incrementa con la reperfusión<sup>20, 37-39</sup>, debido principalmente a que durante la isquemia se genera un ambiente reductor por la falta de aceptor final de electrones; al reintroducirse el  $\text{O}_2$  reacciona rápidamente con éstos por lo que se producen grandes cantidades de ER superando los mecanismos de captura (Figura 2.5).

#### 2.4.4.4 Daño Oxidativo:

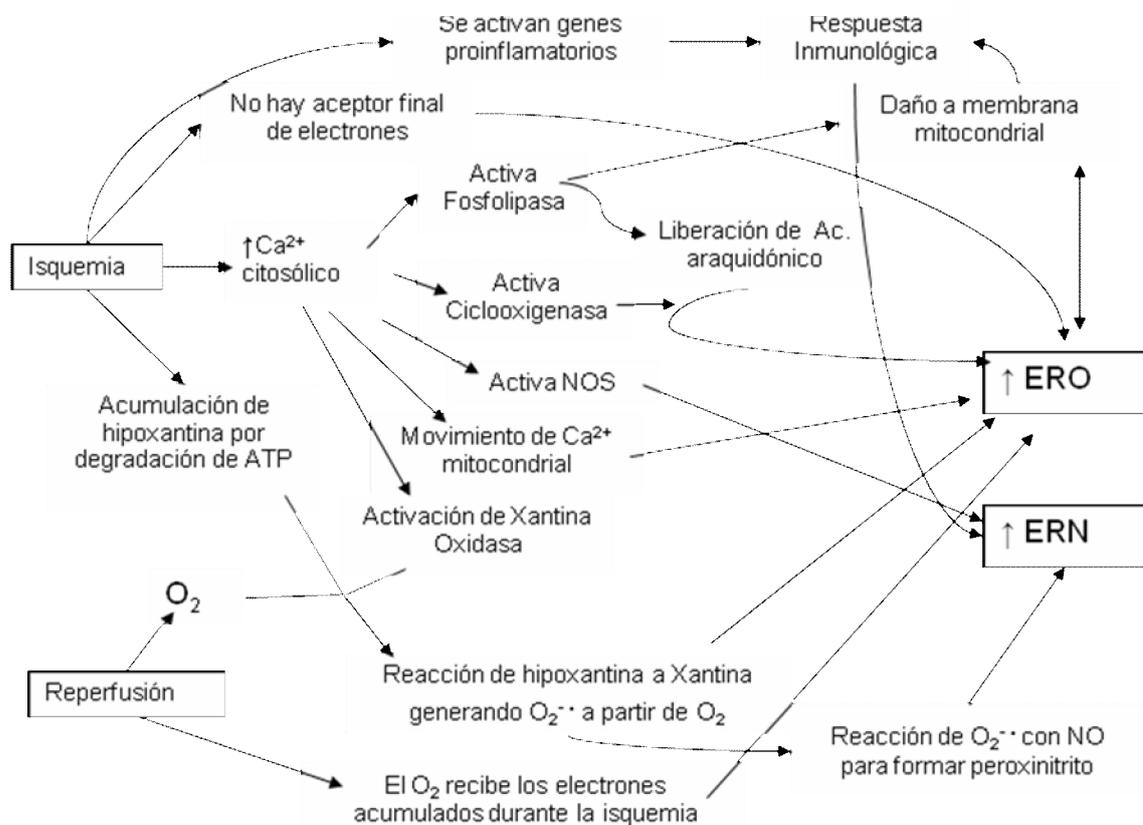
Las ER oxidan a un gran número de moléculas, sus principales blancos son proteínas, lípidos y ADN<sup>40</sup>:

##### *Proteínas:*

Las proteínas son el blanco inicial de oxidación por ER<sup>40</sup>, ésta se da principalmente sobre enlaces insaturados, anillos aromáticos y grupos tiol. Dentro de las principales modificaciones que sufren las proteínas ante la oxidación se encuentran las modificaciones en aminoácidos, la formación de grupos carbonilo, la fragmentación, la formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos y la formación de puentes disulfuro. Estos cambios en la estructura proteica, tienen como efectos principales la pérdida de la

actividad catalítica, la alteración de la estabilidad térmica, cambios en la viscosidad, y una mayor susceptibilidad a la proteólisis<sup>41, 42</sup>.

Las moléculas más afectadas son las proteínas de membrana (canales iónicos, receptores, etc.), las enzimas y las proteínas estructurales<sup>32, 41</sup>. Las RN atacan principalmente grupos sulfhidrido de las cisteínas y los residuos de tirosina



**Figura 2.5.** Incremento de ER en isquemia y reperfusión.

### Lípidos:

Las ER atacan la doble unión de los ácidos grasos poliinsaturados que contienen los fosfolípidos, fragmentándolos. Las estructuras fosfolípídicas de las membranas se desorganizan y destruyen. Este proceso se conoce como lipoperoxidación y afecta a la membranas plasmática, mitocondrial y

de otros organelos como retículo endoplásmico y núcleo con la consiguiente pérdida de su funcionalidad<sup>43</sup>. También daña la barrera hematoencefálica, desencadenando inflamación y apoptosis<sup>17</sup> y causando edema<sup>29</sup>.

La reacción de lipoperoxidación inicia cuando una ER extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena del ácido graso, dejando un electrón desapareado, con lo cual se genera un radical lipídico. Este radical lipídico rápidamente sufre un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular produciendo un radical hidroperoxilo. Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de oxígeno y continúa la reacción en cadena.

Los productos finales de la lipoperoxidación son principalmente aldehídos, gases hidrocarbonados y malondialdehído (MDA). Esos productos de degradación pueden difundir lejos de su lugar de producción y producir edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. También pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos<sup>7, 13, 33, 44</sup>.

#### *Acción sobre el ADN.*

Las ER pueden reaccionar con todos los componentes del ADN dando lugar a gran diversidad de productos y nuevos radicales. Esto tiene como consecuencia la ruptura y desalineación de las bases por hidroxilación, o bien entrecruzamientos entre hebras de ADN, traduciendo en bloqueos de la replicación del ADN celular o bien en mutaciones<sup>32, 33</sup>.

### 2.4.4.3 Defensas Antioxidantes.

Debido al potencial efecto destructivo de las ERO y ERN, la célula cuenta con sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que se coordinan cooperativamente para evitar el daño oxidativo y sus posibles implicaciones. Esta defensa puede organizarse en cuatro niveles: Enzimas antioxidantes, antioxidantes endógenos, antioxidantes exógenos y secuestradores de metales.

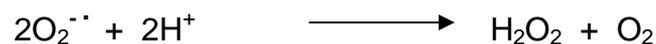
#### 1) Enzimas Antioxidantes:

Las células disponen de enzimas específicas para la neutralización de diversas especies reactivas de oxígeno, las principales son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

A pesar de que la actividad de estas enzimas en el cerebro es menor comparada con hígado y riñón, en los últimos años se ha demostrado el papel de SOD y GPx en el daño cerebral por isquemia y reperfusión a través de diversos estudios de actividad, sobreexpresión o *knockout* en diversos modelos de isquemia cerebral<sup>7, 20, 38, 45</sup>.

- *Superóxido Dismutasa:*

La enzima Superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción de dos aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )<sup>33</sup>. Esto se logra a través de oxidaciones y reducciones sucesivas del metal de transición del sitio activo de la enzima.



En los eucariotas existen tres tipos de SOD de diferente localización, que se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos como producto de genes diferentes. Estos son: 1) CuZn-SOD o SOD1 que es citosólica, 2) MnSOD o SOD2 que se localiza en la mitocondria, y 3) EC-SOD que es también dependiente de cobre y zinc pero es extracelular.

La SOD no es realmente una enzima destoxicante porque el producto de su actividad es un agente tóxico, pero es el primer paso para reducirlo hasta agua. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado es metabolizado por la CAT y la GPx.

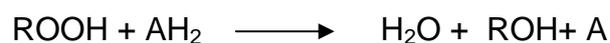
En modelos *in vivo*, como ratones transgénicos con sobreexpresión de SOD1, se ha observado una disminución en el daño causado por isquemia y reperfusión. En ratones *knockout* o con una actividad disminuida de SOD1, este daño aumenta<sup>38, 45</sup>.

- *Catalasa:*

La Catalasa (CAT) se localiza en citosol, mitocondrias y principalmente en peroxisomas. Es una de las enzimas más eficientes, ya que no puede ser saturada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ninguna concentración, catalizando su conversión en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , para proteger a las células del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se genera en su interior:

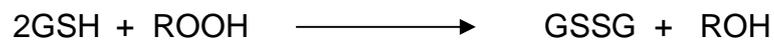


También reacciona como peroxidasa con donadores de protones ( $\text{AH}_2$ ) como metanol, etanol y ácido fórmico



- *Glutación Peroxidasa:*

La Glutación peroxidasa (GPx) reduce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidroperóxidos orgánicos (ROOH) a agua y alcohol (ROH) respectivamente, y para ello utiliza el glutati3n reducido (GSH) como donante de electrones. Se localiza en el citosol.



La GPx es una enzima selenio dependiente, se ubica en citosol, mitocondria y en la membrana celular. Forma parte importante en el mecanismo de protecci3n celular contra el da3o oxidativo a l3pidos de membrana, prote3nas y 3cidos nucleicos. En c3lulas animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificaci3n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la GPx, debido a su localizaci3n citos3lica y a que la CAT presenta mucha menos afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En ratones transg3nicos que sobreexpresan a la GPx, se observa una disminuci3n en el da3o provocado por isquemia y reperfusi3n en un modelo *in vivo*<sup>40</sup>.

## 2) Antioxidantes End3genos:

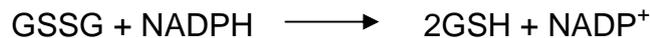
Son sustancias que reaccionan con las ER neutraliz3ndolas ya que la ER le cede un electr3n al antioxidante transform3ndolo en una ER d3bil no t3xica. Tambi3n son conocidos como *scavengers* debido a su capacidad eliminadora de radicales libres. Los principales antioxidantes end3genos son: acido 3rico, melatonina y glutati3n.

- *Glutación:*

El glutatión (GSH) es un tripéptido (Glu-Cys-Gly) que se sintetiza continuamente en la célula. Está presente a concentraciones mayores a 12 mM en células de mamífero<sup>74, 75</sup>. Tiene muchas funciones fisiológicas, una de las más importantes es la defensa contra las ER, donde el GSH está involucrado en dos tipos de reacciones<sup>46-47</sup>:

- 1) Reacciona no-enzimáticamente con radicales como el  $O_2^{\cdot-}$ ,  $NO\cdot$  y  $OH\cdot$ .
- 2) Es el donador de electrones para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx.

El producto final de la oxidación del GSH es el disulfuro de glutatión también llamado glutatión oxidado (GSSG). Este es regenerado en una reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR):



- 3) Antioxidantes Exógenos

Los antioxidantes exógenos se adquieren en la dieta y actúan igual que los antioxidantes endógenos. Los principales son la vitamina E, el ácido ascórbico, los carotenoides, los compuestos sulfurados y los flavonoides.

- 4) Secuestradores de metales

Ciertos metales (como  $Fe^{2+}$  y  $Cu^+$ ) pueden donar electrones en la reacción de Fenton, la cual genera radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Existen sistemas de defensa antioxidante que actúan secuestrando metales y de esta forma evitan la formación de  $OH\cdot$ . Algunos de estos son la transferrina y la lactoferrina, que secuestran el hierro y la ceruloplasmina que secuestra el cobre. De esta forma evitan la formación de ER.

### **2.4.5 Inflamación:**

Durante los primeros minutos de isquemia, ocurre una regulación positiva de genes proinflamatorios que producen mediadores de inflamación como el factor activador de plaquetas, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )<sup>48</sup> y la interleucina 1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ ). También se incrementa la expresión de moléculas de adhesión al endotelio vascular como CAM 1, P-selectinas y E-selectinas. Ante estas señales los neutrófilos migran de la sangre al parénquima cerebral seguidos por los macrófagos y monocitos<sup>17, 23</sup>.

A pesar de que la inflamación se da como respuesta al daño, ésta aumenta el daño neuronal por isquemia<sup>44</sup> debido, entre otras cosas, a: 1) la obstrucción microvascular por neutrófilos, 2) la producción de mediadores tóxicos por las células inflamatorias activadas y neuronas dañadas (citocinas, ON, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y prostanoïdes)<sup>8, 17, 23</sup>, 3) el daño a la barrera hematoencefálica por la entrada de leucocitos<sup>18</sup> y 4) la activación de la apoptosis<sup>17</sup>.

### **2.4.6 Apoptosis:**

La apoptosis, o muerte celular programada es la activación secuencial de una serie de enzimas celulares que producen una degradación ordenada de los elementos nucleares y citoplasmáticos<sup>16</sup>.

Varios procesos como la excitotoxicidad, la formación de radicales libres, la inflamación, el daño a mitocondria y al ADN y la liberación del citocromo C de la mitocondria<sup>20, 28, 49</sup>; activan la apoptosis después de la lesión cerebral por isquemia, particularmente dentro del área de penumbra<sup>13, 23</sup>. La apoptosis es un proceso que consume energía por lo que la reperfusión puede potenciar la apoptosis al restaurar la energía celular<sup>23</sup>.

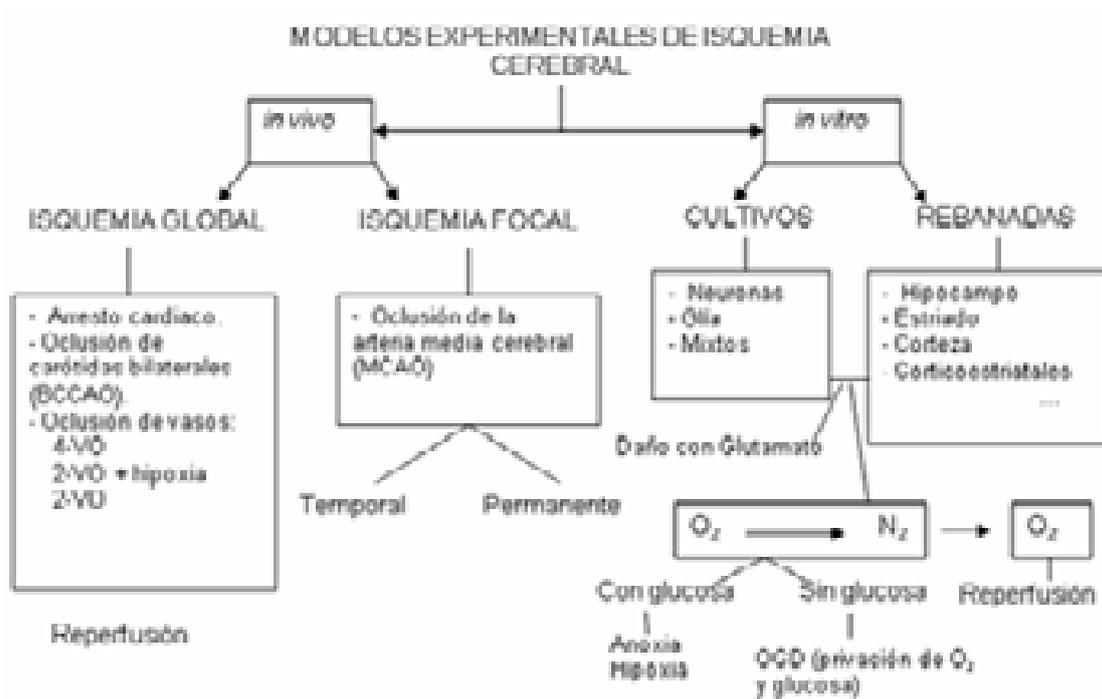
## 2.5 Modelos de Isquemia

Los modelos experimentales son una herramienta indispensable en el campo de investigación en la isquemia cerebral. Han sido utilizados para investigar los mecanismos del daño isquémico, así como para desarrollar nuevas estrategias que minimicen sus repercusiones<sup>50</sup>.

El número y diversidad de los modelos experimentales en esta área ha aumentado en las últimas décadas y los estudios en animales han proporcionado la mayoría del conocimiento de la patofisiología y los mecanismos involucrados en la isquemia cerebral<sup>21, 23, 51-52</sup>.

La rata es el animal normalmente usado en los estudios de isquemia cerebral debido a muchas razones<sup>52</sup>, como la mayor aceptabilidad ética (comparando con modelos en animales superiores)<sup>23, 53</sup>, la similitud con los humanos en la anatomía y fisiología cerebrovascular, la facilidad en su manejo, su tamaño moderado que permite supervisar los parámetros fisiológicos fácilmente y la facilidad de obtener estudios reproducibles. El ratón es el más utilizado cuando se realizan modificaciones genéticas. Normalmente se recomienda que al lograr un resultado positivo en animales pequeños el experimento se reproduzca con animales superiores hasta llegar a primates no humanos.

Existen modelos *in vivo* y modelos *in vitro*. Los modelos *in vivo* pueden ser de isquemia global, isquemia focal permanente, isquemia focal transitoria o de hipoxia/isquemia<sup>21,51</sup>. Para los modelos *in vitro* se han usado cultivos de células neuronales o bien rebanadas de porciones cerebrales como corteza, hipocampo y estriado (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Principales modelos experimentales de isquemia cerebral.

Los modelos *in vitro* ofrecen varias ventajas sobre las técnicas *in vivo* en el estudio de los mecanismos involucrados en la isquemia cerebral:

- Son más rápidos y fáciles de manejar<sup>53</sup>.
- Ofrecen un inmediato y directo acceso al compartimento extracelular, permitiendo evaluar fármacos que no cruzan la barrera hematoencefálica<sup>30, 54</sup>.
- Se puede tener un control total sobre el ambiente extracelular (iones, pH, gases y temperatura)<sup>30, 53-55</sup>.
- Se tiene disponibilidad de análisis funcional, bioquímico y morfológico<sup>53</sup>.
  - Permiten realizar un escaneo de fármacos neuroprotectores de forma más rápida y económica<sup>53</sup>.

## 2.6 Rebanadas Cerebrales:

Desde hace 15 o 20 años se han usado rebanadas de partes del sistema nervioso central para numerosos estudios. La preparación de rebanadas cerebrales es un instrumento inestimable en el estudio de los mecanismos de daño neuronal en isquemia y reperfusión ya que además de ser un sistema *in vitro* sensible y barato<sup>53</sup>, ofrece ventajas sobre el uso de cultivos neuronales, ya que la morfología del tejido no sufre cambios y las conexiones intercelulares entre neuronas y glía se conservan<sup>56</sup>; además se requiere menos tiempo para el desarrollo de la isquemia y reperfusión<sup>57</sup>. La viabilidad depende principalmente del grosor de la rebanada, tiempo de rebanado, manejo cuidadoso del tejido, edad de animales, temperatura y protocolo de incubación.

En estos modelos las rebanadas deben ser delgadas para que el oxígeno y la glucosa del medio de incubación puedan difundir correctamente y mantener vivas a todas las células en la rebanada<sup>30</sup>. En estudios previos<sup>30, 55, 58, 59</sup> se han utilizado rebanadas de 350  $\mu\text{m}$  a 1 mm de grosor, estas últimas son consideradas rebanadas gruesas.

La isquemia es inducida *in vitro* quitando temporalmente la glucosa del medio de incubación y desplazando el oxígeno con burbujeo constante de nitrógeno en el medio de incubación. Estos modelos permiten evaluar el efecto de la reperfusión cuando el oxígeno y la glucosa son devueltos al medio de incubación, proporcionando una oportunidad de evaluar agentes terapéuticos en este punto<sup>29</sup>. En modelos previos desarrollados en rebanadas de cerebro, los tiempos de isquemia y reperfusión varían entre 3 min hasta 2 h para la inducción de isquemia (siendo más común 30 min); y entre 30 min hasta 16 h para la reperfusión (siendo más común 3 h)<sup>30, 55, 58, 59</sup>. La elección de los tiempos de incubación adecuados depende de las determinaciones que se vayan a realizar en el modelo.

La preparación de rebanadas implica un severo trauma al tejido y además un periodo de isquemia antes de que la rebanada se coloque en el medio de

incubación<sup>58-59</sup>. Esto afecta principalmente rebanadas de hipocampo, que son el tejido más sensible al daño por isquemia<sup>30</sup>. Además pueden activarse genes relacionados con el estrés y esto puede alterar la sensibilidad a la isquemia<sup>21</sup>. Esto se puede superar acortando el tiempo de decapitado y rebanado, teniendo cuidado máximo durante la disección y usando soluciones hiperosmóticas durante el corte para evitar el edema<sup>29</sup>. Es común también el uso de soluciones con alto  $Mg^{2+}$  y sin  $Ca^{2+}$  usadas durante el corte y en un periodo de preincubación de las rebanadas<sup>30</sup>. Esto evita el daño durante su obtención ya que el  $Mg^{2+}$  bloquea los receptores de glutamato tipo NMDA evitando su activación y por lo tanto el inicio de la excitotoxicidad. Al quitar el  $Ca^{2+}$  de la solución también se evita la sobreactivación de receptores de glutamato.

La sobrevivencia de las rebanadas en la incubación es dependiente de un continuo y adecuado suplemento de iones, oxígeno y glucosa a todas las células de la rebanada. Es por eso que es recomendable usar rebanadas delgadas (300-500  $\mu m$ ) ya que en rebanadas gruesas (1 mm) se genera un daño debido a la falta de oxígeno y nutrientes al centro de la rebanada<sup>58,59</sup>. También son importantes el mantenimiento de pH y la temperatura los cuales deben estar en un rango fisiológico.

### **3- JUSTIFICACIÓN**

La isquemia cerebral es actualmente una de las principales áreas de investigación en México, debido al alto grado de mortalidad y a que los pacientes que sobreviven a un episodio isquémico, presentan diversos grados de discapacidad, lo que no les permite reasumir su vida normal y los hace dependientes.

Al ser el estrés oxidativo, uno de los principales mecanismos patológicos en la isquemia cerebral y el principal durante el proceso de reperfusión, representa un punto clave para desarrollar nuevas estrategias de neuroprotección.

Por las ventajas que ofrece, el modelo de isquemia y reperfusión en rebanadas cerebrales, puede utilizarse como herramienta para evaluar fármacos antioxidantes con posible actividad neuroprotectora. Sin embargo, debido a las diferencias entre el daño provocado en los distintos modelos de isquemia, es necesario hacer una completa evaluación del estrés oxidativo en este modelo.

## **4- OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General:**

Evaluar el efecto de 0.5 y 1 h de isquemia y diferentes tiempos de perfusión (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h) sobre el estrés oxidativo en un modelo *in vitro* de rebanadas cerebrales de rata.

### **4.2 Objetivos particulares:**

- Establecer las condiciones óptimas de obtención e incubación de rebanadas cerebrales para la inducción de isquemia y perfusión *in vitro*.
- Determinar la viabilidad celular de las rebanadas cerebrales sometidas a isquemia y perfusión y valorar si el daño inducido es reproducible.
- Evaluar el daño oxidativo en rebanadas sometidas a isquemia y perfusión a través de la determinación de: cantidad de glutatión reducido y niveles de lipoperoxidación.
- Evaluar el efecto de la isquemia y la perfusión en rebanadas cerebrales sobre la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

---

## 5- METODOLOGÍA

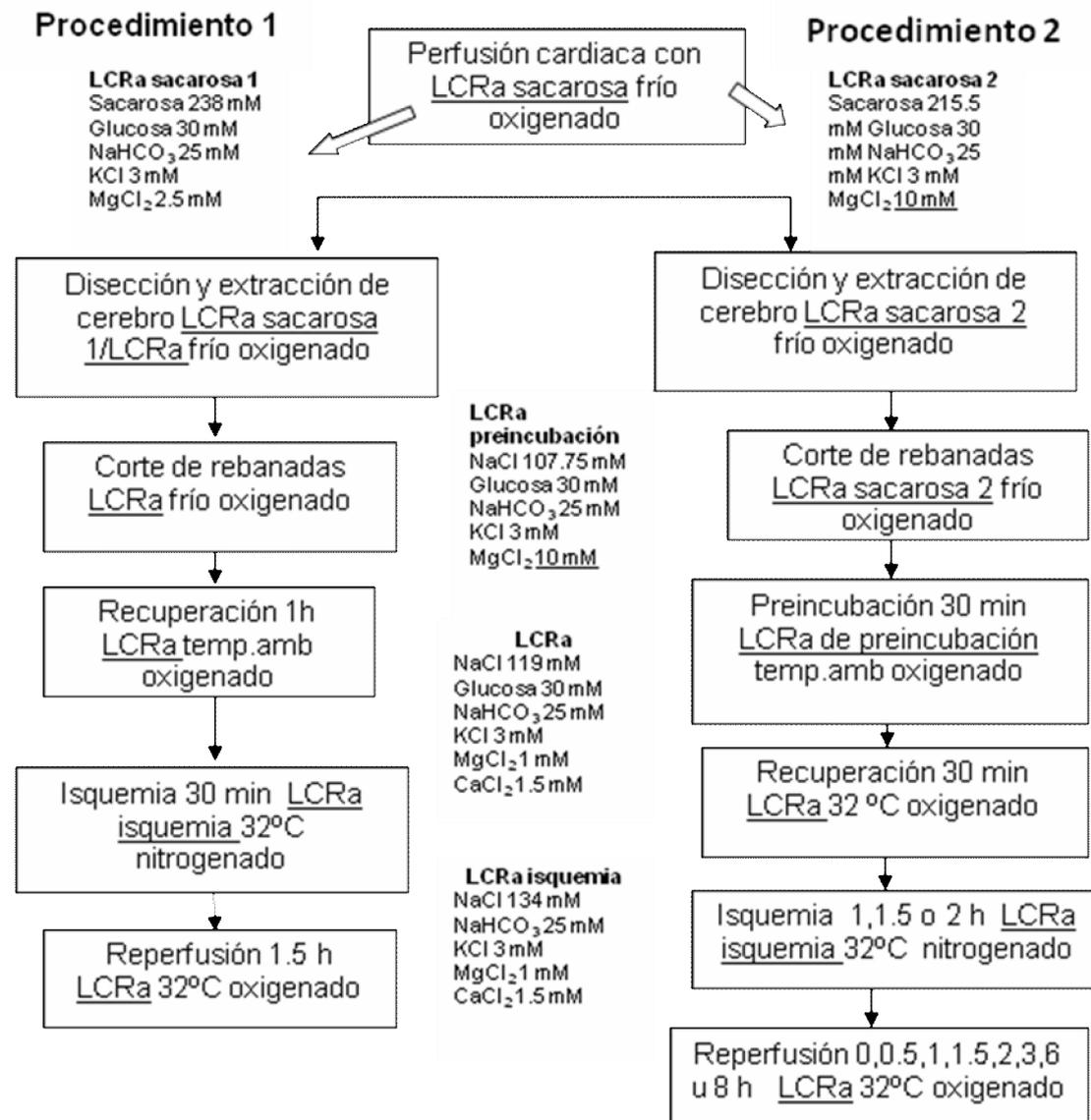
### 5.1 ANIMALES:

Para todos los experimentos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g de peso con alimento y agua *ad libitum*.

### 5.2 OBTENCIÓN DE REBANADAS CEREBRALES:

El proceso de obtención de rebanadas es un procedimiento delicado que requiere rapidez y el control de una baja temperatura. En este trabajo se evaluaron dos distintos procedimientos de obtención de las rebanadas (Figura 5.1).

En ambos modelos cada rata se anestesió con un exceso de pentobarbital sódico (350  $\mu$ L) mediante inyección intraperitoneal, posteriormente la rata se colocó en posición supina sobre una cama de hielo y cuidadosamente se expuso el corazón. Se realizó una perfusión cardiaca con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) con sacarosa frío (procedimiento 1: Sacarosa 238 mM, Glucosa 30 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, KCl 3 mM,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM; pH  $7.4 \pm 0.05$ ; procedimiento 2: Sacarosa 215.5 mM, Glucosa 30 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, KCl 3 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM; pH  $7.4 \pm 0.05$ ) durante un minuto y medio. Esta perfusión se realizó inyectando en el ventrículo izquierdo LCRa con sacarosa con ayuda de una bomba peristáltica (Dynamax, Rainin RP-1; flujo máximo), la aguja se introdujo en el ventrículo izquierdo y se realizó un corte en la aurícula derecha con el fin de drenar la sangre. El medio LCRa con sacarosa se burbujeó media hora antes de la perfusión y durante este proceso con una mezcla de 95% $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ .



**Figura 5.1:** Procedimientos para la obtención e incubación de rebanadas para la inducción *in vitro* de Isquemia/Reperfusion cerebral. LCRa=Líquido cefalorraquídeo artificial

Al final del período de perfusión, la rata se decapitó y la cabeza se colocó en un recipiente con LCRa con sacarosa frío y burbujeado (95%O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>). El cerebro se removió rápidamente y se colocó en una caja Petri con LCRa con sacarosa frío y oxigenado (95%O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>). En el primer procedimiento el LCRa con sacarosa del recipiente para la cabeza y de la caja Petri se mezcló

---

con LCRa normal. Se realizó un corte recto al cerebro para eliminar el cerebelo y el tallo cerebral.

El cerebro se tomó cuidadosamente y se fijó con pegamento a la placa de un vibratomo (Leica VT 1000S). Esta placa se montó en la base del vibratomo que contenía LCRa (procedimiento 1) o LCRa con sacarosa (procedimiento 2), frío burbujeado media hora antes de iniciar el corte y durante este proceso (95%O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>). Las rebanadas se cortaron con una navaja para afeitar de doble filo partida a la mitad a la que se quitó previamente la cera de su superficie y se fijó en el vibratomo. Se obtuvieron rebanadas corticoestriatales de 500 µm.

Por cada rata se obtuvieron de 5 a 6 rebanadas corticoestriatales, las cuales se distribuyeron aleatoriamente entre las condiciones a evaluar.

### **5.3 MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN *in vitro***

Conforme se fueron obteniendo las rebanadas se transfirieron rápida y cuidadosamente a las etapas de incubación correspondientes al procedimiento a seguir (ver figura 5.1). Todos los recipientes de incubación fueron diseñados en el laboratorio. En éstos las rebanadas se colocan sobre una malla de manera que están en contacto completo con el medio de incubación.

#### **5.3.1 Preincubación:**

Las rebanadas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (sólo procedimiento 2, ver figura 5.1) en un recipiente de incubación con LCRa de preincubación (NaCl 107.75 mM, Glucosa 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM; pH 7.4 ± 0.05). Media hora antes de incubar la rebanadas y durante todo este proceso el medio se burbujeó de forma constante con una mezcla de 95%O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>.

### 5.3.2 Recuperación:

Las rebanadas se transfirieron a un molde de incubación con LCRa (NaCl 119 mM, glucosa 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM; pH 7.4 ± 0.05) donde se incubaron 1 h a temperatura ambiente (procedimiento 1) o 30 min a 32°C (procedimiento 2). El LCRa fué burbujeado media hora antes de iniciar la incubación y durante este proceso con una mezcla de 95%O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>.

### 5.3.3 Isquemia:

La isquemia se indujo eliminando el oxígeno y la glucosa del medio de incubación. Esto se realizó a través del burbujeo constante de 95% de N<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a un medio de LCRa sin glucosa (NaCl 134 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM; pH 7.4 ± 0.05).

Una vez finalizado el período de recuperación las rebanadas asignadas como isquémicas se transfirieron a un molde de incubación con LCRa sin glucosa donde se incubaron durante el tiempo de isquemia a 32°C burbujeado media hora antes y durante esta incubación con 95% de N<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> . Las rebanadas asignadas como controles permanecieron en la cámara de recuperación en LCRa pero fueron sujetas a la misma acción mecánica de cambiarlas de medio.

### 5.3.4 Reperusión:

Al término del período de isquemia las rebanadas isquémicas y las controles se transfirieron a un molde de incubación con LCRa donde se incubaron a 32°C durante el tiempo de reperusión burbujeando con 95%O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub> media hora antes y durante el tiempo de incubación.

Al término del período de reperusión cada rebanada se pesó y se almacenó por no más de una semana a -20°C para futuras determinaciones, excepto para la determinación de viabilidad celular en la que se utilizaron inmediatamente. Todas las rebanadas se distribuyeron aleatoriamente para todas las determinaciones a realizar.

---

## 5.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el daño celular en las rebanadas cerebrales se utilizó el método de Preston y Webster (2000)<sup>60</sup> que determina la actividad mitocondrial en el tejido viable, a través de la tinción con cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (TTC).

El TTC es reducido por la succinato deshidrogenasa en las mitocondrias de las células vivas formando depósitos de formazán insolubles en agua. Una mezcla de Etanol:Dimetil sulfóxido (DMSO), se usa para extraer el formazán y medirlo espectrofotométricamente.

Este método ha sido ampliamente usado en la evaluación de isquemia cerebral, ya que permite medir cuantitativamente el daño al tejido de forma sencilla y sensible<sup>47, 61</sup>.

### 5.4.1 Tinción con TTC (Cloruro de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolio).

Al término del período de reperusión, cada rebanada se tiñó con 500  $\mu$ L de solución de TTC al 1% disuelto en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4. Se incubó durante 30 min a 37°C con agitación suave.

### 5.4.2 Extracción de Formazán.

Después de la tinción con TTC las rebanadas se lavaron con solución salina isotónica, se determinó su peso húmedo y se les agregó una mezcla 1:1 de etanol y DMSO en una proporción de 20 mL por gramo de tejido.

El formazán obtenido durante la tinción se extrajo durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente con agitación suave. 50  $\mu$ L de esta solución de extracción se diluyeron con 950  $\mu$ L de la mezcla de extracción. Se determinó la absorbencia a 490 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 530, usando la mezcla de etanol:DMSO como referencia.

El porcentaje de daño de las rebanadas sujetas a isquemia con respecto a las rebanadas control se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ de Daño} = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{Abs_{isq}}{Abs_{ct}} \right) \right]$$

## 5.5 DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO:

Es posible conocer el grado de estrés oxidativo siguiendo la disminución de sustancias antioxidantes o mediante la cuantificación de los productos de las reacciones de oxidación entre los radicales libres y las biomoléculas. Es por eso que en este trabajo se determinaron los niveles de glutatión reducido así como los niveles de malondialdehído, un producto final de la lipoperoxidación.

### 5.5.1 Niveles de Glutatión Reducido:

El glutatión reducido (GSH) en el sobrenadante de las muestras centrifugadas se determinó de acuerdo al método fluorométrico de Hissin y Hilf (1976)<sup>62</sup>. Este método se basa en la reacción del reactivo fluorescente *o*-ftalaldehído (OPT) con el GSH a pH 8.

Cada rebanada se homogenizó con 600  $\mu$ L de FEDTA ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, EDTA 0.005 M, pH 8) y 160  $\mu$ L de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 25% utilizando un homogenizador con punta de teflón *Wheaton* adaptado a un taladro. El homogenado se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 min en una centrífuga con refrigeración a 4°C (Eppendorf 5417 R).

Se tomaron 10  $\mu$ L del sobrenadante a los cuales se añadieron 1.89 mL de FEDTA y 100  $\mu$ L de OPT (1mg/mL en metanol). Después de 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, la reacción se transfirió a una celda de cuarzo para medir fluorescencia (350 nm de excitación y 420 nm de emisión) en un fluorómetro (Perkin Elmer LS55).

Se preparó una curva estándar de GSH en FEDTA con un rango de concentraciones de 0 a 0.015 µg/mL; cada punto de la curva se trató de la misma forma que las muestras. La concentración de GSH en cada muestra se determinó interpolando el valor de fluorescencia en la curva estándar y multiplicando la concentración obtenida por el factor de dilución (2 mL/0.01 mL=200). La concentración de GSH en el sobrenadante se dividió entre el peso de la rebanada cerebral para obtener los microgramos de GSH por miligramos de peso de tejido.

### 5.5.2 Niveles de Lipoperoxidación:

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la oxidación de los lípidos por los radicales libres. Determinar los niveles de MDA es un excelente parámetro para evidenciar la oxidación no enzimática de los lípidos de las membranas celulares. Un método muy utilizado que mide MDA de forma indirecta es el de TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*). Se basa en la capacidad de reacción de una molécula de MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un cromógeno rosado que es fácilmente cuantificable por fluorescencia, ya que presenta un máximo de absorción entre 532-535 nm.

Cada rebanada se homogenizó en 500 µL de HEPES (NaCl 0.1 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.001M, NaHCO<sub>3</sub> 0.005M, CaCl<sub>2</sub> 0.001M, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 0.006 M, HEPES 0.01M). El homogenado obtenido se vertió en un tubo eppendorf de 1.5 mL al cual se realizaron cuatro orificios en la tapa con ayuda de una aguja. Se añadieron 500 µL de solución de TBA (para 100 mL: 0.75g de TBA, 15 g de ácido Tricloroacético, 2.54 mL de HCl concentrado y se aforó con H<sub>2</sub>O) y se calentó a baño María durante 20 min. Se dejó enfriar 5 min sumergiendo cada tubo en hielo. Se centrifugó a 10,500 rpm durante 20 min y se separó el sobrenadante.

Se preparó una curva estándar de tetrametoxipropano (TMPO) en amortiguador de fosfatos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7.4) con un rango de concentraciones de 0 a 11.84 nmoles/mL, el TMPO genera MDA por hidrólisis ácida. Cada punto de la curva se trató de la misma forma que las muestras. Se

---

determinó la absorbencia de cada sobrenadante a 532 nm. La concentración de MDA en cada muestra se determinó interpolando su absorbencia en la curva estándar. La concentración obtenida se dividió entre el peso de la rebanada cerebral para obtener los nanomoles de MDA por miligramo de tejido.

## **5.6 ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

### **5.6.1 Homogeneización de las rebanadas**

A través de este proceso se obtuvieron los sobrenadantes para determinar la actividad de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), así como la cantidad de proteínas en dichos sobrenadantes.

Cada rebanada se homogeneizó con 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis (Tris 10 mM pH 7.9, NaCl 15 mM, Sacarosa 0.25 mM) con 2.5  $\mu$ L de inhibidores de proteasas (Sigma).

EL homogenizado se dividió en dos partes: 1) 100  $\mu$ L se colocaron en un tubo eppendorf donde se agregó bajo agitación 25  $\mu$ L de Tritón X-100 al 1%. Este homogenizado se utilizó para medir la actividad de catalasa. 2) El resto del homogenizado se utilizó para determinar la actividad de SOD y GPx. Ambas partes del homogenizado se centrifugaron durante 30 min a 12,000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -20°C por no más de una semana. En cada sobrenadante se determinó la concentración de proteínas.

### **5.6.2 Cuantificación de las proteínas**

Se utilizó del método de Lowry *et al.* (1951)<sup>63</sup>, en el cual iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos iones  $\text{Cu}^{2+}$ , provocan también el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina, los cuales en medio básico reducen el reactivo de Folín-Ciocalteau. 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 que se detecta espectrofotométricamente a 660 nm.

Para determinar la cantidad de proteínas en el sobrenadante de cada muestra se tomaron 15  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se diluyeron con 485  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, de esta dilución se tomaron 200  $\mu\text{L}$ , los cuales se mezclaron con 1 mL de reactivo C (50 mL de reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%,  $\text{NaOH}$  0.4%, Tartrato de sodio 0.02% y 1 mL de reactivo B:  $\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$  0.5%). La mezcla se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:1 del reactivo de Folín en  $\text{H}_2\text{O}$  y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro usando un blanco con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

En cada experimento se realizó una curva patrón utilizando un estándar de albúmina sérica bovina (ASB) con concentraciones de 0 a 50  $\mu\text{g}$  de proteína. Cada punto de esta curva estándar se manejó al igual que las muestras y se determinó igualmente su absorbencia a 660 nm. Interpolando la lectura de absorbencia de cada muestra en la curva patrón se obtuvieron los microgramos de proteína en el tubo de reacción. Para calcular la concentración de proteínas en el sobrenadante de cada muestra se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{g de Proteína}}{\mu\text{L}_{sb}} = \frac{AB_{\text{muestra}}}{200\mu\text{L}_{\text{rxn}}} \times \frac{500\mu\text{L}_{\text{dil}}}{15\mu\text{L}_{\text{sb}}}$$

Donde:

$\mu\text{g}_{\text{prot rx}}$  = Valor obtenido al interpolar la lectura de absorbencia de la muestra en la curva patrón.

$\mu\text{L}_{sb}$  =  $\mu\text{L}$  de sobrenadante.

$\mu\text{L}_{dil}$  =  $\mu\text{L}$  de dilución.

### 5.6.3 Actividad de la Catalasa (CAT)

Se utilizó el método de Aebi (1984)<sup>64</sup> que mide la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la catalasa en las muestras.

En una celda de cuarzo se colocaron 50 µL del sobrenadante con Tritón obtenido en el proceso de homogenización (ver sección 6.6.1). Se agregaron 700 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7. Se mezcló rápidamente y se leyó la absorbencia a 240 nm cada 30 seg durante 2 min en un espectrofotómetro Beckman DU 530, mediante cinética simple, tomando como blanco el amortiguador de fosfatos 10 mM.

Se usó la constante de reacción de primer orden ( $k$ ) como unidad de actividad de la catalasa. Esta se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$k = \left( \frac{1}{\Delta t} \right) \left( \ln \frac{A_1}{A_2} \right)$$

Donde:

$\Delta t$  = intervalo de tiempo medido =  $t_2 - t_1 = 2$  min

$A_1$  y  $A_2$  = las absorbancias de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la muestra a los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ .

Los resultados se expresan como  $k/\mu\text{g}$  proteína, donde  $k$  debe multiplicarse por el factor de dilución ( $1/50=0.02$ ) y dividirse entre la cantidad de proteínas en la muestra.

### 5.6.4 Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó por el método de Flohé y Ötting (1984)<sup>65</sup> que utiliza un sistema de Xantina / Xantina oxidasa para generar superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el cual reduce al nitroazul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán. La

SOD en la muestra reacciona con el superóxido descomponiéndolo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> por lo que disminuye la reacción del superóxido con el NBT.

Se tomaron 10 µL del sobrenadante obtenido en el proceso de homogenización (ver sección 6.6.1) y se diluyeron con 990 µL de amortiguador de fosfatos 5 mM. Se tomaron 165 µL de esta dilución que se agregaron en un tubo de ensayo con 815 µL de la mezcla de reacción (Xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 µM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 49 mM y ASB 0.006%). Se añadieron 20 µL de una solución de Xantina oxidasa (2.5 mg/mL en sulfato de amonio) y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se detuvo la reacción con 0.33 mL de CuCl<sub>2</sub> 0.8 mM y se determinó la absorbencia a 560 nm. Para cada muestra se realizó un blanco tratado igual que la muestra pero sin Xantina oxidasa, restando su absorbencia a cada muestra.

Para determinar el 100% de reducción de NBT se agregaron a un tubo de ensayo 815 µL de la mezcla de reacción, 165 µL de H<sub>2</sub>O destilada y 20 µL de la solución de Xantina oxidasa. Se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 0.33 mL de CuCl<sub>2</sub> 0.8 mM y se determinó la absorbencia a 560 nm.

Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad que reduce el cambio de absorbencia en un 50%. Las unidades de SOD en el sobrenadante se calcularon con la siguiente fórmula:

$$U\ SOD/\mu L_{s2} = \left[ \frac{Abs_{100\%} - (Abs_{FB} - Abs_B)}{0.05 \times Abs_{100\%}} \right] \times \frac{1000\mu L_{d11}}{165\mu L_{d11} \times 10\mu L_{s2}}$$

Donde:

**Abs<sub>100%</sub>** = Promedio de absorbencias resultantes de las reacciones de 100% de reducción del NBT.

**Abs<sub>Pb</sub>** = Absorbencia de la reacción con la muestra y la enzima.

**Abs<sub>Pb</sub>** = Absorbencia de la reacción con la muestra sin enzima (blanco de la muestra).

**μL<sub>sb</sub>** = μL de sobrenadante.

**μL<sub>dil</sub>** = μL de dilución.

Finalmente los resultados se normalizaron por contenido de proteínas expresándose en U/μg de proteína

### 5.6.5 Actividad de la Glutación peroxidasa (GPx)

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976)<sup>66</sup> en el cual la GPx cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acoplada a la oxidación del Glutación reducido (GSH) a Glutación oxidado (GSSG). El GSSG a su vez es reducido por la Glutación reductasa (GR) en presencia de NADPH (Figura 5.2). La disminución de la concentración de NADPH se detecta a 340 nm.

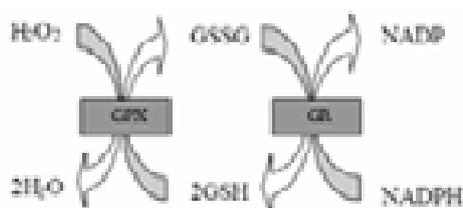


Figura 5.2 Reacciones acopladas para la determinación de actividad de GPx. La GPx en la muestra reduce al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidando al GSH, la GR genera de nuevo GSH requiriendo al NADPH como cofactor, la desaparición de este último se detecta espectrofotométricamente a 340 nm

En una celda de cuarzo se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se mezclaron con 800  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción (EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y 1 U de GR/mL; en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7), se incubó durante 5 min y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7). Se agitó rápidamente y mediante una cinética simple se leyó la absorbencia a 340 nm cada 30 seg durante 3 min, tomando como blanco el amortiguador de fosfatos 50 mM.

Para calcular la actividad inespecífica de la GPx se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos 50 mM a los cuales se dio el mismo seguimiento que a la muestra. La actividad de la GPx se expresa como U GPx/mg de proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto bajo las condiciones experimentales empleadas, las unidades de GPx en el sobrenadante se obtienen mediante la siguiente fórmula:

$$U_{GPx}/\mu\text{L}_{sb} = \left[ \frac{(\Delta Abs/min)_{pb} - (\Delta Abs/min)_{in}}{\left( 6.22 \times 10^5 \mu\text{L} / \mu\text{mol} \cdot \text{cm} \right) (1 \text{ cm}) (50 \mu\text{L}_{sb})} \right] [=] \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \mu\text{L}_{sb}}$$

Donde:

$(\Delta A/min)_{pb}$  = pendiente de la porción lineal de la curva en la reacción problema.

$(\Delta A/min)_{in}$  = pendiente de la porción lineal de la curva en la reacción inespecífica.

$6.22 \times 10^5 \mu\text{L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$  = absortividad micromolar del NADPH a 340 nm.

1 cm = longitud del paso de luz en la celda.

$\mu\text{L}_{sb}$  =  $\mu\text{L}$  de sobrenadante utilizados para el ensayo enzimático.

**5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA, seguido de una prueba de Bonferroni. Cada grupo de isquemia y reperfusión (IR) se comparó con su respectivo control (CT) mediante la prueba de T de student. En ambos casos se empleó el programa Prism 2.01, Grad Pad (San Diego, CA). Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 6- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PARA LA INDUCCIÓN DE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSIÓN

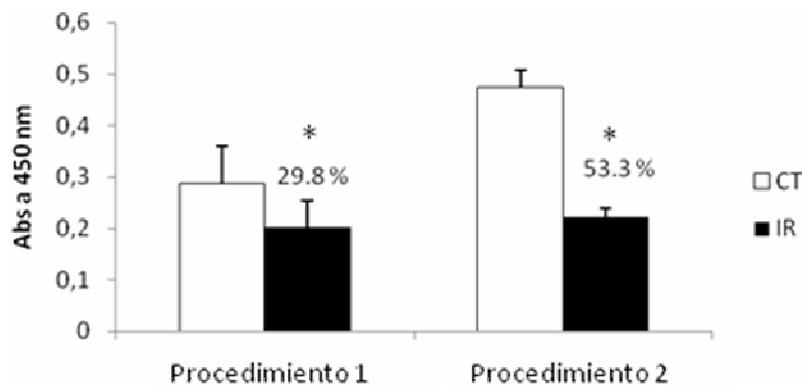
Al inicio de ese trabajo, se evaluó la viabilidad celular con dos diferentes procedimientos de obtención e incubación de rebanadas cerebrales para la inducción *in vitro* de isquemia y reperfusión. Las diferencias y características de estos procedimientos se muestran en la Tabla 6.1. En el procedimiento 1 se indujo isquemia por 30 min y reperfusión por 1.5 h; en el procedimiento 2 se indujo isquemia por 1 h y reperfusión por 1.5 h.

Etapa	Procedimiento 1	Procedimiento 2
Perfusión	LCRa con sacarosa, sin Ca <sup>2+</sup> y con MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM	LCRa con sacarosa, sin Ca <sup>2+</sup> y con MgCl <sub>2</sub> 10 mM
Extracción de cerebro	Mezcla de LCRa de perfusión y LCRa con CaCl <sub>2</sub> 1.5 mM y MgCl <sub>2</sub> 1 mM	LCRa con sacarosa, sin Ca <sup>2+</sup> y con MgCl <sub>2</sub> 10 mM
Corte (obtención de rebanadas)	LCRa normal	LCRa con sacarosa, sin Ca <sup>2+</sup> y con MgCl <sub>2</sub> 10 mM
Preincubación	Sin preincubación	30 min LCRa, sin Ca <sup>2+</sup> y con MgCl <sub>2</sub> 10 mM
Recuperación	1 h, temperatura ambiente, LCRa normal	30 min, 32 °C, LCRa normal
Isquemia	30 min, 32°C, LCRa sin glucosa	1 h, 32°C, LCRa sin glucosa
Reperfusión	1.5 h, 32 °C, LCRa normal	

LCRa= Líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl 119 mM, glucosa 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM; pH 7.4 ± 0.05)

**Tabla 6.1.** Procedimientos evaluados para la inducción de isquemia y reperfusión *in vitro* en rebanadas cerebrales.

La viabilidad celular se determinó a través de la tinción/extracción con TTC. El porcentaje de daño de las rebanadas sometidas a isquemia y reperfusión se obtuvo con respecto a las rebanadas control (ver sección 6.4).



**Figura 6.1. Viabilidad celular en dos modelos de isquemia/reperfusión *in vitro*.** La viabilidad se presenta como Abs a 450 nm de una dilución 1:20 de la solución de extracción de formazán después de la tinción con cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio. La Abs es proporcional a la viabilidad. Se muestra el porcentaje de daño de las rebanadas sometidas a isquemia y reperfusión con respecto a las rebanadas control. \* =  $p < 0.05$  vs su CT. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 7$ .

Siguiendo el procedimiento 1, la diferencia entre la viabilidad de las rebanadas control y de las rebanadas sujetas a 30 min de isquemia y 1.5 h de reperfusión es significativa, pero no muy evidente. El porcentaje de daño por isquemia y reperfusión fue solamente de  $29.8 \pm 17.66\%$ , comparado con las rebanadas control y como se observa, la dispersión de los datos es muy grande (Figura 6.1). Esto puede deberse a que 30 min de isquemia, no son suficientes para provocar un daño considerable, o bien a que las rebanadas control están dañándose durante todo el proceso. Por esto se aumentó el tiempo de isquemia y se realizaron modificaciones encaminadas a mejorar la calidad de las rebanadas, creando así el procedimiento 2.

Al seguir el procedimiento 2 el daño de las rebanadas sujetas a 1 h de isquemia y 1.5 h de reperfusión es más evidente,  $53.3 \pm 3.46\%$  de daño promedio, además se observa una menor dispersión de los datos en cada grupo (Figura 6.1).

Para obtener una mayor viabilidad en las rebanadas, en la literatura se recomienda que durante la extracción y el corte del cerebro se utilicen medios hiperosmóticos, sin calcio y ricos en magnesio<sup>67</sup>. Los medios hiperosmóticos contienen compuestos de alto peso molecular como la sacarosa o el dextran<sup>59</sup> que al no poder atravesar la membrana celular evitan el edema celular al evitar

la entrada de agua a los tejidos. Al eliminar el calcio del LCRa de perfusión se evita la sobreactivación de los receptores de glutamato. Por otro lado el magnesio bloquea los receptores de glutamato tipo NMDA evitando su activación y por lo tanto el inicio del proceso de excitotoxicidad durante la preparación de las rebanadas (ver Figura 2.3). Algunos autores consideran 2 mM, una concentración alta de  $Mg^{2+}$ <sup>53</sup>; por ello esta concentración se utilizó para el procedimiento 1. Por otro lado otros autores consideran alta hasta 10 mM<sup>30, 67</sup> por lo que esta concentración se utilizó en el procedimiento 2.

En el procedimiento 1 se utilizó medio hiperosmótico sin  $Ca^{2+}$  y alto en  $Mg^{2+}$  durante la perfusión y la extracción del cerebro pero no durante el corte de las rebanadas y es en este proceso donde las células cerebrales sufren mayor trauma. En el procedimiento 2 el corte se realizó en este tipo de medio, además se agregó una etapa de preincubación después del corte de las rebanadas, con un medio bajo en  $Ca^{2+}$  y con  $Mg^{2+}$  10 mM<sup>67-69</sup>.

La perfusión cardiaca con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) adicionado con sacarosa, sin calcio y rico en magnesio; no se ha utilizado en modelos previos<sup>29, 30, 53-61</sup>. Debido a la composición, la baja temperatura y la continua oxigenación del medio, esta etapa facilita la extracción del cerebro y el corte de las rebanadas, evitando además el edema y la excitotoxicidad. Otros autores realizan esta perfusión con solución salina fría o con medios fríos ricos en sacarosa<sup>67,68</sup>.

Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad de las rebanadas control aumenta de  $0.29 \pm 0.07$  a  $0.47 \pm 0.03$  de absorbencia a 450 nm, con el procedimiento 1 y el procedimiento 2 respectivamente (ver figura 6.1). Esto indica que las condiciones usadas en el procedimiento 2 mejoran la calidad de las rebanadas cerebrales, permitiendo obtener datos confiables y reproducibles, por lo que las modificaciones realizadas al procedimiento 1 fueron acertadas. Debido a esto decidimos utilizar el procedimiento 2 para las determinaciones posteriores. Los tiempos de isquemia y de reperfusión pueden

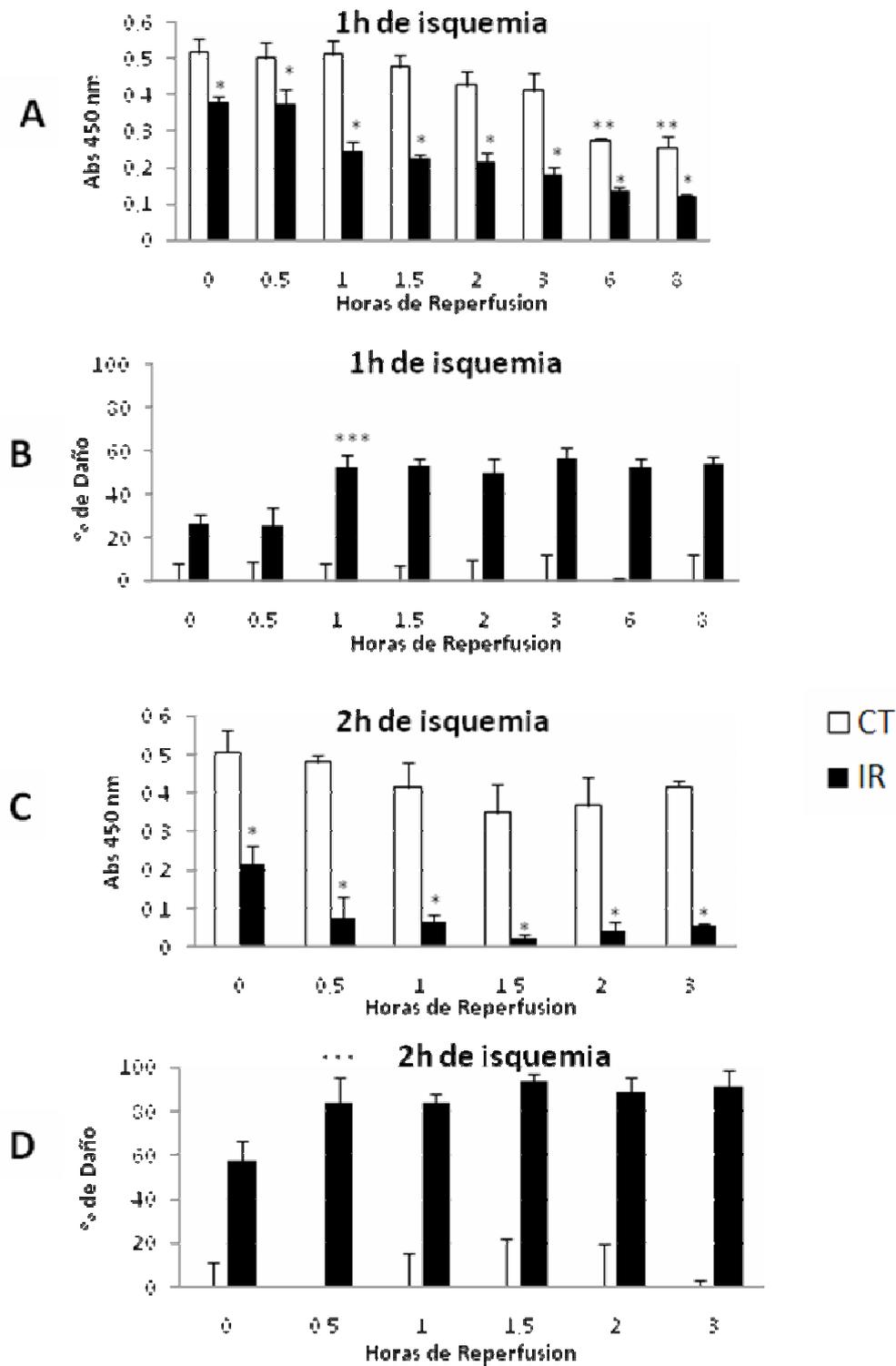
variar pero el protocolo a seguir para la obtención de las rebanadas, la preincubación y la recuperación debe mantenerse.

## **6.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR A DIFERENTES TIEMPOS DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.**

Dado que la calidad de las rebanadas cerebrales mejoró con las modificaciones hechas, se utilizó el procedimiento 2 para las determinaciones posteriores (ver sección 5.2). Se evaluaron tiempos de isquemia de 1 y 2 h. Para cada tiempo de isquemia se evaluaron tiempos de reperfusión de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h.

Se determinó la viabilidad celular a través de la tinción/extracción con TTC. Para cada tiempo de isquemia y reperfusión se calculó el porcentaje de daño con respecto al promedio de las rebanadas control. Los resultados se muestran en la Figura 6.2.

La incubación de las rebanadas control por seis o más horas después de la recuperación, disminuye la viabilidad celular de  $0.514 \pm 0.042$  a  $0.275 \pm 0.0038$  de absorbencia a 450 nm en las rebanadas control correspondientes a 0 y 6 h de reperfusión, respectivamente (Figura 6.2 A). A pesar de que al utilizar el procedimiento 2 se mejoró la calidad de las rebanadas, la incubación prolongada disminuye la viabilidad celular. Esto puede deberse a una posible contaminación bacteriana o a un daño producido por la forma de obtención de rebanadas. Respecto a la contaminación bacteriana, Mathews y colaboradores<sup>57</sup> al evaluar tiempos de reperfusión mayores a 4 h esterilizan las cámaras de incubación y el medio, logrando obtener rebanadas viables después de 16 h de incubación. Por otro lado en otros estudios la reperfusión no es mayor a 2 h. Con respecto a la obtención de rebanadas algunos autores como Lipton y colaboradores<sup>68</sup> recomiendan adicionar compuestos antioxidantes en el medio de incubación a lo largo de todo el experimento; sin embargo, adicionar este tipo de compuestos en nuestro modelo, afectaría la determinación del daño por estrés oxidativo al tejido inducido por la isquemia y la reperfusión.



**Figura 6.2. Evaluación de viabilidad según el tiempo de isquemia y reperfusion.** Rebanadas corticoestriatales de 500  $\mu$ m fueron sometidas tiempos de isquemia y reperfusion variables. **A y C** muestran la Abs a 450 nm de una dilucion 1:20 de la solucion de extraccion de formazan despues de tincion con cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio. La Abs es proporcional a la viabilidad. **B y D** muestran el porcentaje de daño de las rebanadas IR con respecto a las rebanadas control. \*  $p < 0.05$  vs su CT, \*\*  $p < 0.05$  vs CT a 0 h de reperfusion, \*\*\*  $p < 0.05$  vs % de daño a un tiempo de reperfusion anterior. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 6$ .

Estudios previos<sup>29, 53, 61</sup>, han reportado que a mayor tiempo de isquemia aumenta el porcentaje de daño con o sin reperfusión. Los resultados obtenidos muestran claramente que se genera un 26.4% de daño al someter a las rebanadas a 1 h de isquemia sin reperfusión, mientras que en 2 h de isquemia se genera un daño de 57.32% (Figura 6.2 B y D).

Se sabe que la reperfusión añade efectos deletéreos al daño causado por la isquemia, debido principalmente a la formación de especies reactivas de oxígeno<sup>16</sup>. En las rebanadas sujetas a 1 h de isquemia, no se observan cambios significativos con 30 min de reperfusión, sin embargo con 1 h de reperfusión el porcentaje de daño aumenta de 26.4% a 52.5% y se mantiene hasta las 8 h de reperfusión evaluadas (Figura 6.2 B). En rebanadas sujetas a 2 h de isquemia, la reperfusión de 30 min basta para que el daño aumente de 57.32% a 84.01%, 1 h o más de reperfusión no modifica el porcentaje de daño alcanzado (Figura 6.2 D). Hasta ahora no existen reportes donde se analice la viabilidad celular en rebanadas cerebrales sometidas a un tiempo de isquemia fijo y tiempos de reperfusión variables.

Debido a que 2 h de isquemia inducen daño muy agresivo para las rebanadas cerebrales, se decidió trabajar con 1 h de isquemia en las siguientes determinaciones. Este tiempo de isquemia, permitirá evaluar potenciales fármacos con posible actividad neuroprotectora.

### **6.3 EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO**

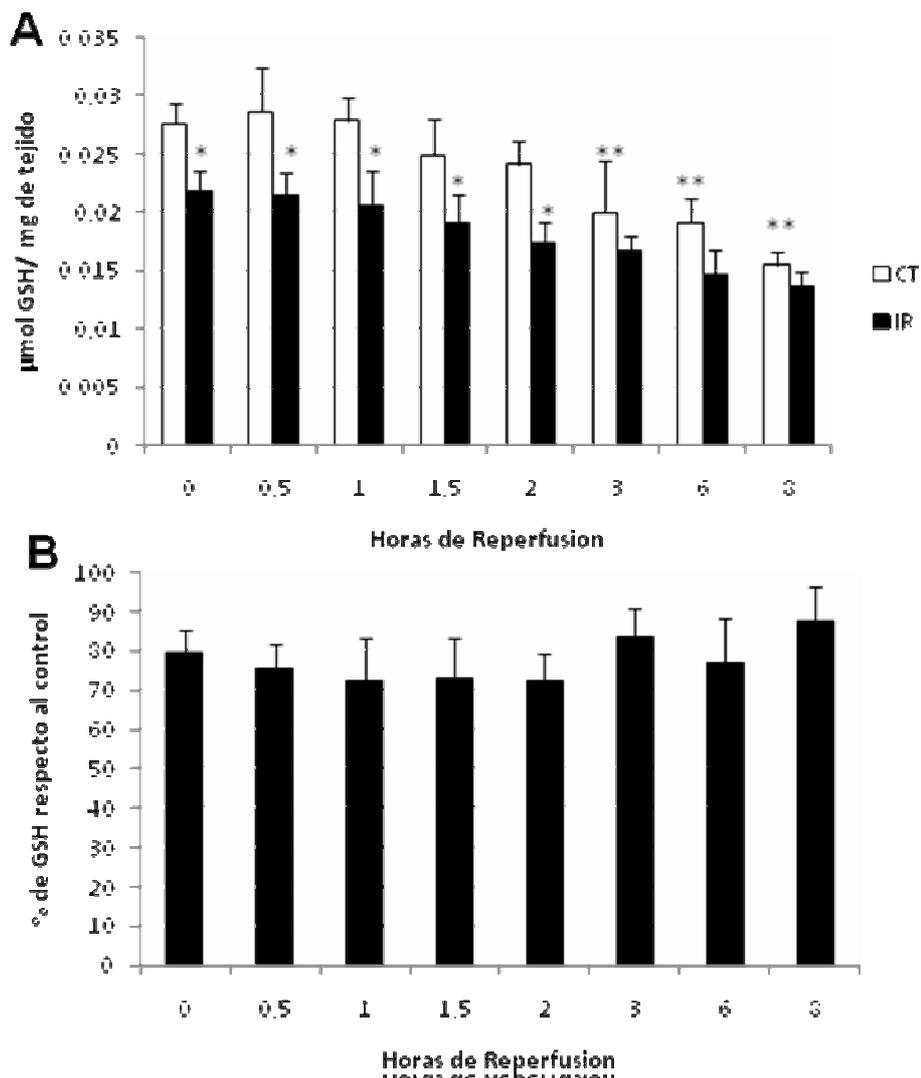
El daño oxidativo se determinó a través de los niveles de glutatión reducido (GSH) y lipoperoxidación en rebanadas corticoestriatales de 500  $\mu\text{m}$  sometidas a 1 h de isquemia. Se evaluaron distintos tiempos de reperfusión 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6 y 8 h.

### 6.3.1 Niveles de Glutación Reducido (GSH)

El GSH es el principal antioxidante no enzimático de la célula; por ello el mantener sus niveles es crítico para la supervivencia celular durante el proceso isquémico<sup>70</sup>. La disminución o inhibición del GSH durante la isquemia incrementa la susceptibilidad de la membrana a los peróxidos<sup>71</sup>.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la incubación de las rebanadas control, por más de 3 h después de la recuperación, provoca una disminución en la cantidad de GSH (Figura 6.3 A). Esta disminución es de 23.2, 30.9 y 43.9% en las rebanadas control correspondientes a 3, 6 y 8 h de reperfusión, respectivamente. Esto indica que existe un daño oxidativo en las rebanadas que no fueron sometidas a isquemia, aún antes de que este daño se vea reflejado en la viabilidad celular, en la que no se observó una disminución significativa en las rebanadas control a 3 h de reperfusión (Figura 6.2 A). De la Cruz y colaboradores<sup>53</sup>, observaron que en rebanadas cerebrales de 1 mm, la suma de GSH y glutación oxidado (GSSG) en las rebanadas control, disminuye ligeramente conforme aumenta el tiempo de incubación, con un tiempo máximo de incubación de 2 h la diferencia no fue significativa.

En las rebanadas sujetas a isquemia y reperfusión, la cantidad de GSH es menor que en los controles en todos los tiempos de reperfusión evaluados, excepto a 8 h de reperfusión donde el daño en los controles no permite ver diferencias significativas (Figura 6.3 A). En nuestras condiciones la isquemia por sí misma disminuye aproximadamente 20% la cantidad de GSH en las rebanadas debido al estrés oxidativo que se genera durante la isquemia, ya que el GSH se utiliza como cofactor de la enzima glutación peroxidasa (GPx) para detoxificar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o los hidroperóxidos orgánicos y puede detoxificar radicales libres por vías no enzimáticas<sup>46, 47</sup>, por lo tanto se acumula en su estado oxidado (GSSG). Además se ha reportado que la glutación reductasa (GR), enzima que se encarga de regresar el GSSG a su estado reducido, se encuentra disminuida de 23 a 56 % después de 2 h de isquemia y 22 h de reperfusión en modelos *in vivo*<sup>72-74</sup>.



**Figura 6.3. Determinación de glutatión reducido (GSH).** **A** muestra la cantidad de GSH en rebanadas de 500  $\mu\text{m}$  con 1 h de isquemia y tiempos de reperfusion variables. \*  $p < 0.05$  vs CT al tiempo evaluado; \*\*  $p < 0.05$  vs CT a tiempo 0 de reperfusion. **B** muestra el porcentaje de GSH de las rebanadas sometidas a isquemia y reperfusion con respecto a las rebanadas control. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 6$ .

El tiempo de reperfusion no tuvo ningun efecto sobre el contenido de GSH, ya que el porcentaje de GSH con respecto al control, se mantiene igual en todos los tiempos de reperfusion evaluados (Figura 6.3 B). Esto puede deberse a que el dano causado durante 1 h de isquemia sobrepasa la capacidad de las celulas para regenerar el GSH.

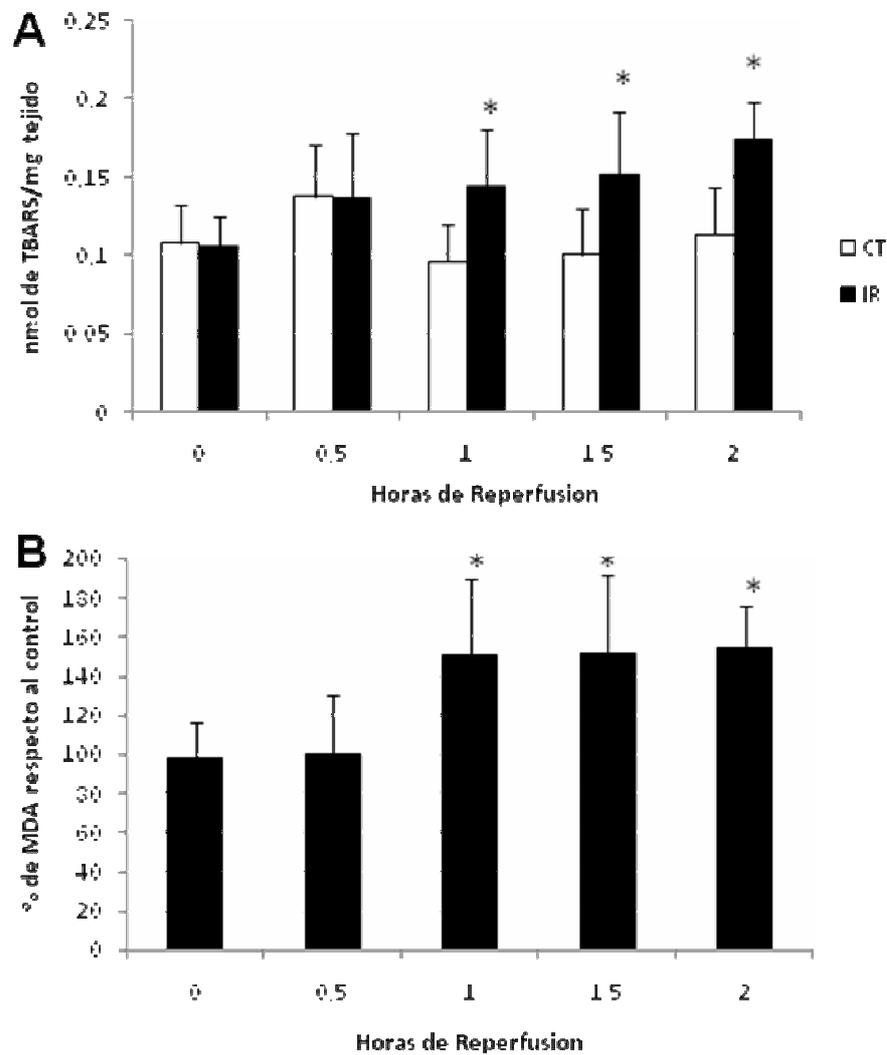
La disminución en el GSH ya se había reportado en distintos modelos de isquemia cerebral. En un modelo *in vitro* en rebanadas de hipocampo (el tejido más sensible a la isquemia) sometidas a 30 min de privación de oxígeno y glucosa, el GSH disminuyó más del 50%<sup>75</sup>, comparado con las rebanadas control. En modelos *in vivo* de isquemia cerebral, se ha observado una disminución aproximada del 50% en el GSH después de 2 h de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) y 22 h de reperfusión<sup>71-74</sup>. Todos estos datos sugieren que el daño inducido en el modelo *in vitro* empleado, es menor que el daño que se induce en modelos *in vivo* de isquemia cerebral focal con 2 h de isquemia y 22 h de reperfusión.

### 6.3.2 Niveles de Lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación se determinaron a través del método de TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) en rebanadas corticoestriatales de 500  $\mu\text{m}$  sometidas a 1 h de isquemia y reperfusión de 0, 0.5, 1 y 2 h. El método de TBARS permite cuantificar los productos finales de la reacción de lipoperoxidación, que es la reacción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, con los lípidos celulares. Por lo tanto este es un método indirecto para evaluar el grado del daño oxidativo al tejido, específicamente sobre los lípidos.

En el modelo empleado, no se observaron cambios en los niveles de lipoperoxidación durante la isquemia (sin reperfusión) ni con 30 min de reperfusión (Figura 6.4). Esto indica que la lipoperoxidación no es un evento primario en el proceso isquémico y coincide con lo reportado por De la Cruz y colaboradores<sup>53</sup>, quienes en rebanadas cerebrales de 1 mm, 30 min de isquemia no tienen efecto sobre la lipoperoxidación.

En las rebanadas isquémicas sometidas a 1, 1.5 y 2 h de reperfusión, se observó un aumento de casi 50% en los niveles de lipoperoxidación, sin embargo la dispersión de los datos es muy grande (Figura 6.4).



**Figura 6.4. Niveles de lipoperoxidación.** **A-** Los niveles de lipoperoxidación se determinaron por el método de TBARS en rebanadas de 500  $\mu\text{m}$  con 1 h de isquemia y tiempos de reperfusion variables. **B** muestra el porcentaje de MDA de las rebanadas sometidas a isquemia y reperfusion con respecto a las rebanadas control. \*  $p < 0.05$  vs CT a tiempo 0 de reperfusion. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 6$ .

En modelos *in vivo* se ha reportado, un aumento de lipoperoxidación después de la isquemia y la reperfusion. En modelos de isquemia focal, los resultados son variables obteniéndose un aumento en la lipoperoxidación desde 22 hasta 77 % con 2 h de isquemia y 22 h de reperfusion<sup>71-74, 76</sup>.

En el modelo de isquemia global inducida por oclusión bilateral de la arteria carótida común (BCCAO), se ha reportado un incremento del 200% en la lipoperoxidación después de 30 min de isquemia y 30 min de reperfusión<sup>77</sup>; y un incremento del 300% después de 20 min de isquemia y 24 h de reperfusión<sup>78</sup>. Probablemente el daño causado por la reperfusión sea provocado solamente al inicio de ésta, por la llegada súbita de oxígeno y su reacción con las especies reducidas acumuladas durante la isquemia, generando metabolitos tóxicos; por lo que el daño generado no depende del tiempo en que la oxigenación continúa.

#### **6.4 ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Se determinó la actividad de las principales enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en rebanadas sometidas a 1 h de isquemia y tiempos de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 6 h de reperfusión

##### **6.4.1 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD)**

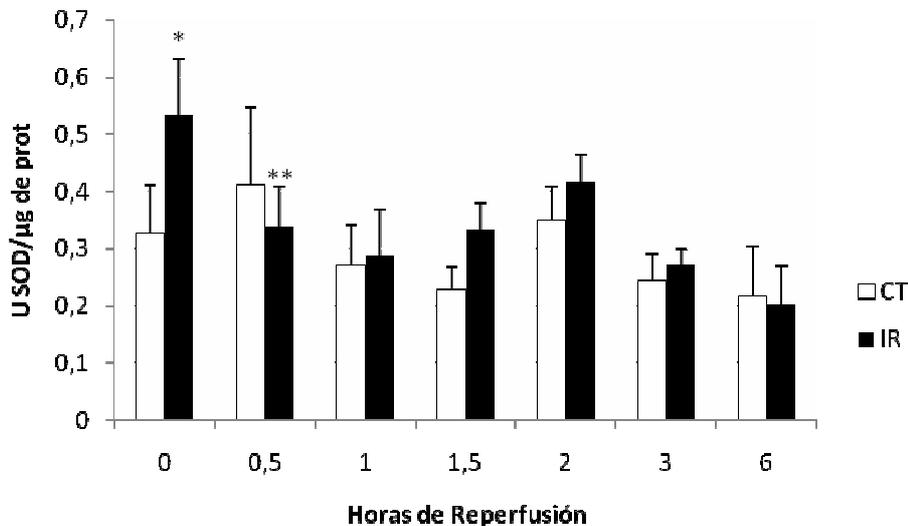
La SOD cataliza la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  para formar  $H_2O_2$ . Su papel en la isquemia cerebral ha sido ampliamente estudiado, observándose que la sobreexpresión de cualquiera de sus isoformas disminuye el daño causado por isquemia y reperfusión<sup>38,45</sup> y la disminución de su expresión en ratones *knockout* o heterocigos (+/-), lo aumenta<sup>38</sup>. La administración de SOD formando complejos con lecitina para que pueda cruzar la barrera hematoencefálica y para dar mayor estabilidad a la enzima aumentando su vida media; ha mostrado neuroprotección en modelos de isquemia cerebral<sup>79</sup>.

El daño producido por la isquemia y la reperfusión disminuye la actividad de la SOD. En modelos *in vivo* de isquemia focal, la actividad de la SOD en el hemisferio isquémico, disminuye 36% después 30 min de isquemia y 24 h de reperfusión<sup>80</sup> y entre 30 y 50% con 2 h de isquemia y 22 h de reperfusión<sup>72-73-75</sup>.

En modelos de isquemia global, la actividad de la SOD en el hemisferio isquémico, disminuyó aproximadamente 27% después de 30 min de isquemia y 30 min de reperfusión<sup>77</sup> y 36% después de 20 min de isquemia y 24 h de reperfusión<sup>78</sup>.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren de lo reportado anteriormente en modelos *in vivo*, ya que en las rebanadas sometidas a 1 h de isquemia sin reperfusión, la actividad de SOD incrementa (Figura 6.5). Sin embargo en las rebanadas sometidas a 1 h de isquemia y 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 6 h de reperfusión, la actividad de SOD es igual que en sus controles. Esto quizá se deba al daño generado en el modelo, que como se ha visto es menor al provocado en modelos *in vivo* y por tanto permite observar este incremento inicial de la SOD que probablemente sea una respuesta al daño. Una vez iniciada la reperfusión el daño aumenta afectando quizá la actividad de la enzima por lo que ya no se refleja el aumento inicial.

En otro modelo *in vitro* usando rebanadas de hipocampo se observó una disminución en la actividad de la SOD del 50% después de 30 min de privación de oxígeno y glucosa (POG)<sup>75</sup>, sin embargo debemos recordar que el hipocampo es el tejido más sensible a la isquemia. El daño generado en nuestro modelo no refleja claramente la respuesta de la SOD al daño por isquemia y reperfusión.

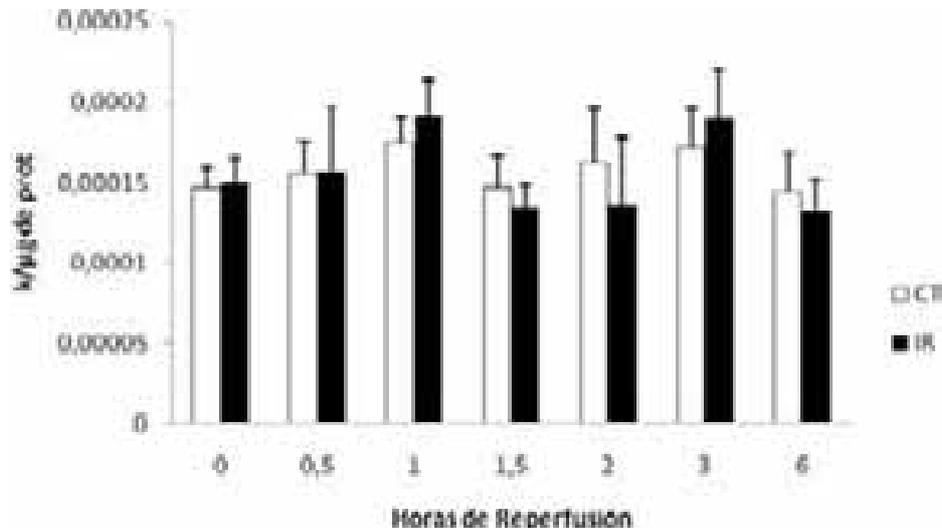


**Figura 6.5. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD).** Rebanadas corticoestriatales de 500  $\mu\text{m}$  se sometieron a 1 h de isquemia y tiempos de reperusión variables. La actividad de SOD se presenta como U SOD/  $\mu\text{g}$  de proteína. \*  $p < 0.05$  vs CT al tiempo evaluado; \*\*  $p < 0.05$  vs IR a tiempo de reperusión anterior. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 6$ .

#### 6.4.2 Actividad de Catalasa (CAT):

La CAT cataliza la conversión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Junto con la GPx reduce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado en la reacción catalizada por la SOD. Está localizada principalmente en peroxisomas.

La información reportada anteriormente sobre la actividad de la CAT en distintos modelos de isquemia y reperusión cerebral, es muy variada. En modelos *in vivo* se ha observado una disminución en la actividad de la CAT de 30 a 45% después de 2 h de isquemia focal y 22 h de reperusión<sup>71-74, 76</sup> y de 65% después de 30 min de isquemia global y 24 h de reperusión<sup>78</sup>. Yaman y colaboradores<sup>77</sup> reportan una disminución de 34% en la actividad de CAT después de 30 min de isquemia global y 30 min de reperusión, sugiriendo que la disminución en la actividad de CAT es una consecuencia temprana del daño. Sin embargo en otro modelo con 10 min de BCCAO de isquemia global moderada la CAT aumenta 63% con sólo 10 min de isquemia.



**Figura 6.6. Actividad de Catalasa (CAT).** Rebanadas corticoestriatales de 500  $\mu\text{m}$  se sometieron a 1 h de isquemia y tiempos de reperfusion variables. La actividad de catalasa se presenta como  $\text{k}/\mu\text{g}$  de proteina. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 6$ .

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran ningún efecto de la isquemia, ni de los diferentes tiempos de reperfusion sobre la actividad de la CAT (Figura 6.6).

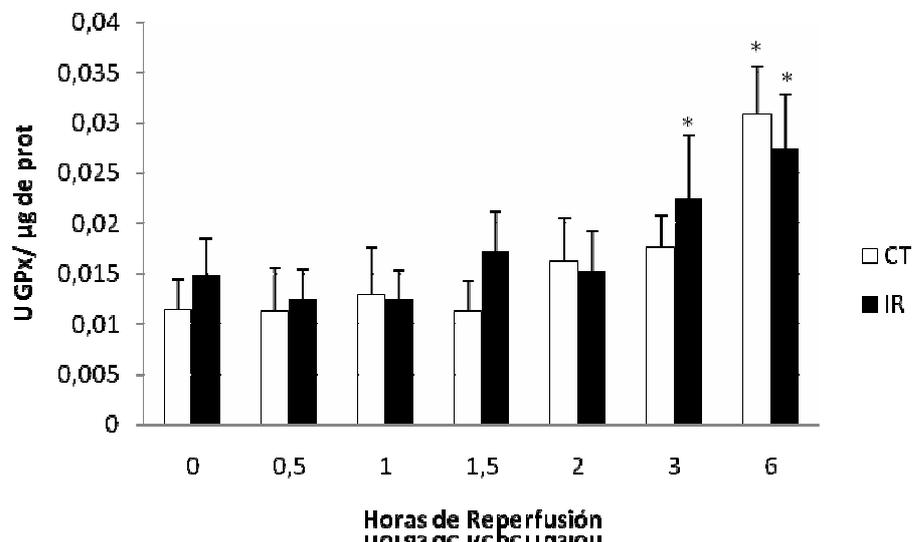
#### 6.4.3 Actividad de Glutación peroxidasa (GPx):

La GPx es la principal vía de reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , para lo cual utiliza el GSH como donador de electrones. También reduce hidroperóxidos orgánicos generando alcoholes.

La información que se tiene acerca del cambio en la actividad de la GPx en modelos de isquemia y reperfusion es muy variada, probablemente porque el grado de daño provocado en cada modelo es distinto. En modelos *in vivo* la actividad de la GPx en el hemisferio isquémico, disminuye entre 30 y 50% después de 2 h de isquemia focal y 22 h de reperfusion<sup>72-74,76</sup>. Después de 20 min de isquemia global y 24 h de reperfusion la actividad de la GPx no se

modifica<sup>78</sup>. Sin embargo en un modelo de isquemia focal después de 30 min de isquemia y 24 h de reperfusión la actividad de GPx disminuye aproximadamente 50%<sup>80</sup>. En un modelo *in vitro* en rebanadas de hipocampo sometidas a 30 min de POG, la actividad de la GPx disminuye más del 50%<sup>75</sup>, mientras que en rebanadas cerebrales de 1 mm sujetas a 90 min de hipoxia la actividad de la GPx aumenta un 25%<sup>24</sup>.

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran diferencias significativas en la actividad de GPx entre las rebanadas sometidas a isquemia y reperfusión y las rebanadas control a ningún tiempo evaluado (Figura 6.7). Sin embargo se observa un aumento en la actividad de GPx en las rebanadas sometidas a más de 3 h de reperfusión, así como en las control (Figura 6.7). Estos resultados pueden deberse a que el grado de daño provocado en este modelo es moderado, por lo que no se afecta la actividad de la GPx. En las rebanadas con mayor tiempo de incubación, la GPx podría aumentar como respuesta al mayor daño y esto podría estar relacionado con la disminución en el GSH a estos tiempos de incubación (ver figura 6.3)



**Figura 6.7. Actividad de Glutati6n Peroxidasa (GPx).** Rebanadas corticoestriatales de 500 µm se sometieron a 1 h de isquemia y tiempos de reperfusi6n variables. La actividad de GPx se presenta como U GPx/µg de prote6na. \*  $p < 0.05$  vs CT a tiempo 0. Los datos se presentan como la media + DE.  $n \geq 6$ .

---

## 7- CONCLUSIONES:

- Se establecieron las condiciones óptimas de obtención e incubación de rebanadas cerebrales, para la inducción de isquemia y reperfusión *in vitro*.
- El uso de un medio hiperosmótico sin calcio y con magnesio 10 mM durante la extracción y corte de las rebanadas cerebrales permitió mejorar la sobrevivencia de las rebanadas control.
- Las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, permitieron obtener un porcentaje de daño reproducible cuando se evalúa la viabilidad celular a través de la técnica de tinción extracción de TTC.
- Al aumentar el tiempo de isquemia se incrementa el porcentaje de daño de las rebanadas sometidas a isquemia y reperfusión.
- Las rebanadas cerebrales sometidas a 1 h de isquemia y 1, 1.5, 2 y 3 h de reperfusión presentaron un daño aproximado del 50%.
- El daño isquémico está relacionado con el estrés oxidativo ya que:
  - a) La cantidad de GSH disminuye 20% en las rebanadas sometidas a 1 h de isquemia y reperfusión de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 h.
  - b) La lipoperoxidación aumentó 50% en las rebanadas cerebrales sometidas a 1 h de isquemia y reperfusión de 1, 1.5 y 2 h.
- El modelo *in vitro* desarrollado en este trabajo no nos permitió observar la respuesta de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx, probablemente se requiera de un daño menor para poder observar diferencias.

---

**8- REFERENCIAS:**

- 1) R. M. Vázquez. *Proceso de atención de enfermería en la enfermedad vascular cerebral isquémica*. Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica 2002,10 : 33-37.
- 2) S. L. Robbins, R. S Cotran, V. Kumar. *Patología estructural y funcional*. Elsevier España 2005, 7<sup>ma</sup> edición; pp. 1365-1368.
- 3) E. Díez-Tejedor, O. Del Brutto, J. Álvarez-Sabín, M. Muñoz , G. Abiusi. *Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares*. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Revista de Neurología 2001, 33: 455-464.
- 4) C. J. Murray, A. D. Lopez. *Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study*. Lancet 1997, 349: 1269–1276.
- 5) R. Gil de Castro, A. C. Gil-Nuñez. *Factores de riesgo del ictus isquémico; I. Factores de riesgo convencionales*. Revista de Neurología 2000, 31 (4): 314-323.
- 6) J. L. Ruiz, C. K. González. *Enfermedad Cerebral Vascular Isquémica en dos hospitales mexicanos*. Revista Mexicana de Neurociencias 2003, 4: 319-323.
- 7) R. M. Adibhatla, J. F. Hatcher. *Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia*. Free Radical Biology & Medicine 2006, 40: 376 – 387.
- 8) J. Rodrigo, A.P. Fernández, J. Serrano, M.A. Peinado, A. Martínez. *The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia*. Free Radical Biology & Medicine 2005, 39: 26– 50.
- 9) *Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001*. Salud pública de México 2002, 44: 565-581.
- 10) *Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2002*. Salud pública de México 2004, 46:169-175.
- 11) *Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2003*. Salud pública de México 2005, 47: 171-187.
- 12) <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>

- 
- 13) B. White, J. Sullivan, D. De Gracia, B. O'Neil, R. Neumar, L. Grossman, A. Rafols, G. Krause. *Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury*. Journal of the Neurological Sciences 2000, 179: 1–33.
- 14) J. Marx, R. Hockberger, R. Walls. *Rosen Medicina de Urgencias*. Elsevier España 2003, 5<sup>ta</sup> Edición. pp.52-56.
- 15) L. Massieu. 1999. *Muerte por isquemia y anoxia*. En: *Enfermedades Neurodegenerativas mecanismos moleculares*. H. Pasantes, C. Arias, L. Massieu, A. Zentella, R. Tapia (EDS). Fondo de Cultura Económica. México D.F; pp. 64-92.
- 16) A. Macaya. Muerte celular en hipoxia-isquemia neonatal. *Revista de Neurología* 2000, 31: 784-789.
- 17) U. Dirnagl, C. Iadecola, M. Moskowitz. *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends in Neurosciences 1999, 22: 391–397.
- 18) H. B. Juurlink, M. Sweeney. *Mechanisms that result in Damage During and following Cerebral Ischemia*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 1997, 21: 121-128
- 19) A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox. *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega, Barcelona España 1995; pp. 257, 772.
- 20) T. Sugawara, M. Fujimura, N. Noshita, G. Whan Kim, A. Saito, T. Hayashi, P. Narasimhan, C. Maier, P. Chan. *Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral*. Ischemia NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 2004, 1: 17-25.
- 21) P. Lipton. *Ischemic Cell Death in Brain Neurons*. Physiological Reviews 1999, 79: 1431-1568.
- 22) J. Perez Velazquez, M. Frantseva, P. Carlen. *In Vitro Ischemia Promotes Glutamate-Mediated Free Radical Generation and Intracellular Calcium Accumulation in Hippocampal Pyramidal Neurons*. The Journal of Neuroscience 1997, 17: 9085–9094.
- 23) A. Durukan, T. Tatlisumak. *Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal*

- cerebral ischemia*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2007, 87: 179–197.
- 24) A. Schurr, R. Payne, M. Heine, B. Rigor. *Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation*. *Journal of Neuroscience Methods* 1995, 59: 129-138.
- 25) P. Kleihues, K. A. Hossmann. *Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia*. *Brain Research* 1971, 35: 409-418.
- 26) G. Mies, S. Ishimaru, Y. Xie, K. Seo, K. A. Hossmann. *Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1991, 11: 753-761.
- 27) I. Reynolds, T. Hastings. *Glutamate Induces the Production of Reactive Oxygen Species in Cultured Forebrain Neurons Following NMDA Receptor Activation*. *The Journal of Neuroscience* 1995, 15: 3318-3327.
- 28) J. M. Lee, M. C. Grabb, J. G. Zipfel, D. W. Choi. *Brain tissue responses to ischemia*. *The Journal of Clinical Investigation* 2000, 106: 723-731.
- 29) D. G. MacGregor, M. V. Avshalumov, M. E. Rice. *Brain edema induced by in vitro ischemia: causal factors and neuroprotection*. *Journal of Neurochemistry* 2003, 85: 1402–1411.
- 30) D. Fernández, J. Martínez, I. Casanova, B. Bonet, J. C. Leza, P. Lorenzo, M. Moro, I. Lizasoain. *Immature rat brain slices exposed to oxygen–glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy*. *Journal of Neuroscience Methods* 2005, 145: 205–212.
- 31) O. Vergun, A. Sobolevsky, M. Yelshansky, J. Keelan, B. Khodorov, M. Duchen. *Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture*. *Journal of Physiology* 2001, 531: 147-163.
- 32) D. Ferrer, C. Jorge, I. Cutiño, R. E. García, D. L. Arce. *Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal*. *Medisan* 1999, 3: 5-11.

- 
- 33) K. Blomgren & H. Hagberg. *Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain*. *Free Radical Biology & Medicine* 2006, 40: 388–397.
- 34) I. Lizazoin, A. Moro, G. R. Knowles, V. Darley-Usmar, S. Moncada. *Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose*. *Biochemical Journal* 1996, 314: 877-880.
- 35) F. X. Guix, I. Uribesalgo, M. Coma, F. J. Muñoz. *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain*. *Progress in Neurobiology* 2005, 76: 126–152
- 36) L. Dugan, S. Sensi, L. Canzoniero, I. Handran, S. Rothman, T. Lin, M. Goldberg, D. Choi. *Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Cortical Neurons Following Exposure to N-Methyl-D-Aspartate*. *The Journal of Neuroscience* 1995, 75(10): 6377-6366.
- 37) O. Peters, T. Back, U. Lindauer, C. Busch, D. Megow, J. Dreier, U. Dirnagl. *Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1998, 18: 196-205.
- 38) Chan P. H. *Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2001, 21: 2-14.
- 39) Y. Gursoy-Ozdemir, A. Can, T. Dalkara. *Reperfusion-Induced Oxidative/Nitrative Injury to Neurovascular Unit After Focal Cerebral Ischemia*. *Stroke* 2004, 35: 1449-1453.
- 40) J. Du, J. M. Gebicki. *Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004, 36: 2334–2343.
- 41) A. Salvi, P. Carrupt, J. Tillement, B. Testa. *Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding*. *Biochemical Pharmacology* 2001, 61: 1237-1242.

- 
- 42) A. Díaz, J. Membrillo. *Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos*. TIP Revista especializada en ciencias Químico-Biológicas 2006, 9(1): 34-44.
- 43) J. M. Braugher, E. D. Hall. *Central nervous system trauma and stroke I. Biochemical Considerations for Oxygen Radical Formation and Lipid Peroxidation*. Free Radical Biology & Medicine 1989, 6: 289-301.
- 44) M. Alexandrova, P. Bochev. *Oxidative stress during the chronic phase after stroke*. Free Radical Biology & Medicine 2005, 39: 297–316.
- 45) P. Maldonado, P. Aguilera, A. Barrón-Ortega, S. García de la Cadena-Farfán, M. E. Chánez-Cárdenas. “*The role of superoxide dismutase in cerebral ischemia damage*” (2008) In: “*Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications*”. Díaz-Muñoz M, Santamaría A, S. G. Pandalai (Editors). Research Signpost, Kerala, India (Aceptado, Diciembre, 2007).
- 46) R. Dringen. *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Progress in Neurobiology 2000, 62: 649-671.
- 47) R. Dringen, J. M. Gutterer, J. Hirrlinger. *Glutathione metabolism in brain Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. European Journal of Biochemistry 2000, 267: 4912-4916.
- 48) O. Hurtado, A. Cárdenas, I. Lizasoain, L. Bosca, J. Leza, P. Lorenzo, M. Moro. *Up-regulation of TNF- $\alpha$  convertase (TACE/ADAM17) after oxygen–glucose deprivation in rat forebrain slices*. Neuropharmacology 2001, 40: 1094–1102.
- 49) I. Unal-Cevik, M. Killinc, A. Can, Y. Gursoy-Ozdemir, T. Dalkara. *Apoptotic and Necrotic Death Mechanisms Are Concomitantly Activated in the Same Cell After Cerebral Ischemia*. Stroke 2004, 35: 2189-2194.
- 50) J.M. Roda, F. Carceller, J. M. Pascual, M. G. Herguido, F. Gonzales Llanos, M. Alonso de Celiñana, C. Avendaño, E. Diez Tejedor. *Modelos Animales Experimentales en isquemia cerebral*. Neurología 1998, 13(9): 427-430.

- 
- 51) K. Hossmann. *Experimental models for the investigation of brain ischemia*. Cardiovascular Research 1998, 39: 106–120.
- 52) M. Macrae. *New models of focal cerebral ischaemia*. British Journal of Clinical Pharmacology 1992, 34: 302-308.
- 53) S. Sbrenna, G. Calo, A. Siniscalchi, I. Badini, C. Bianchi, L. Beani. *Experimental protocol for studying delayed effects of in vitro ischemia on neurotransmitter release from brain slices*. Brain Research Protocols 1998, 3: 61–67.
- 54) B. Sullivan, D. Leu, D. Taylor, C. Fahlman, T. Bickler. *Isoflurane Prevents Delayed Cell Death in an Organotypic Slice Culture Model of Cerebral Ischemia*. Anesthesiology 2002, 96: 189–195.
- 55) J. P. De La Cruz, A. Guerrero, González-Correa, M. Arrebola, Sánchez de la Cuesta. *Antioxidant Effect of Acetylsalicylic and Salicylic Acid in Rat Brain Slices Subjected to Hypoxia*. Journal of Neuroscience Research 2004, 75: 280–29.
- 56) M. Finley, D. Fairman, D. Liu, P. Li, A. Wood, S. Cho. *Functional validation of adult hippocampal organotypic cultures as an in vitro model of brain injury*. Brain Research 2004, 1001: 125–132.
- 57) K. Mathews, D. McLaughlin, L. Ziabari, C. Toner, P. Street, E. Hisgrove, L. Bezzina, J. Stamford. *Rapid quantification of ischaemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining*. Journal of Neuroscience Methods 2002, 102: 43–51.
- 58) S. Hrabetova, K. Chen, D. Masri, C. Nicholson. *Water Compartmentalization and Spread of Ischemic Injury in Thick-Slice Ischemia Model*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2002, 22: 80–88.
- 59) S. Hrabetova, C. Nicholson. *Dextran Decreases Extracellular Tortuosity in Thick-Slice Ischemia Model*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2000, 20: 1306–1310.

- 
- 60) E. Preston, J. Webster. *Spectrophotometric measurement of experimental brain injury*. Journal of Neuroscience Methods 2000, 94: 187–192.
- 61) Q. Xue, B. Yu, Z. Wang, H. Chen. *Effects of ketamina, midazolam, thiopental and propofol on brain ischemia injury in rat cerebral cortical slices*. Acta Pharmacologica Sinica 2004, 25: 115-120.
- 62) P. J. Hissin, R. Hilf. *A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues*. Analytical Biochemistry 1976, 74: 214-227.
- 63) O. H. Lowry, N. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. *Protein measurement with the Folin Phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry 1951, 193: 265-275.
- 64) H. Aebi. *Catalase in vitro*. Methods in Enzymology 1984,105: 121-126.
- 65) L. Flohe, F. Ötting. *Superoxide Dismutase Assays*. Methods in Enzymology 1984,105: 93-104.
- 66) R. A. Lawrence, R. F. Burk. *Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1976, 71: 952-958.
- 67) P. Aitken, G. Breese, F. Dudek, F. Edwards, M. Espanol, P. Larkman, P. Lipton, G. Newman, T. Nowak, K. Panizzon, K. Raley-Susman, K. Reid, M. Rice, J. Sarvey, D. Schoepp, M. Segal, C. Taylor, T. Teyler, P. Voulalas. *Preparative methods for brain slices: a discussion*. Journal of Neuroscience Methods 1995, 59: 139-149.
- 68) P. Lipton, P. Aitken, F. Dudek, K. Eskessen, M. Espanol, P. Ferchmin, J. Kelly, N. Kreisman, P. Landfield, P. Larkman, L. Leybaert, G. Newman, K. Panizzon, R. Payne, P. Phillips, K. Raley-Susman, M. Rice, R. Santamaria, J. Sarvey, A. Schurr, M. Segal, V. Sejer, C. Taylor, T. Teyler, V. Vasilenko, S. Veregge, S. Wu, R. Wallis. *Making the best of brain slices: comparing preparative methods*. Journal of Neuroscience Methods 1995, 59: 51-156.

- 
- 69) Ira S. Kass, Peter Lipton. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. *Journal of Physiology* 1982, 332: 459-472.
- 70) C. Zimmermann, K. Winnefeld, S. Streck, M. Roskos, R. L. Haberl. *Antioxidant Status in Acute Stroke Patients and Patients at Stroke Risk*. *European Neurology* 2004, 51: 157-161.
- 71) S. Salim, M. Ahmad, K. Zafar, A. Ahmad, F. Islam. *Protective effect of Nardostachys jatamansi in rat cerebral ischemia*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003, 74: 481–486.
- 72) S. Ahmad, S. Yousuf, T. Ishrat, M. B. Khan, K. Bhatia, I. Salem, J. Salamat Khan, N. H. Ansari, F. Islam. *Effect of dietary sesame oil as antioxidant on brain hippocampus of rat in focal cerebral ischemia*. *Life Sciences* 2006, 79: 1921–1928.
- 73) S. Yousuf, S. Salim, M. Ahmad, A. Ahmed, M. Ansari, F. Islam. *Protective effect of Khamira Abresham Uood Mastagiwala against free radical induced damage in focal cerebral ischemia*. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, 99: 179–184.
- 74) S. Saleem, M. Ahmad, A. S. Ahmad, S. Yousuf, M. Ansari, M. B. Khan, T. Ishrat, F. Islam. *Behavioral and Histologic Neuroprotection of Aqueous Garlic Extract After Reversible Focal Cerebral Ischemia*. *Journal of Medicinal Food* 2006, 9: 537–544.
- 75) A. Rawal, M. Muddeshwar, S. Biswas. *Rubia cordifolia, Fagonia cretica linn and Tinospora cordifolia exert neuroprotection by modulating the antioxidant system in rat hippocampal slices subjected to oxygen glucose deprivation*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2004, 4: 1-9.
- 76) C. Zhan, J. Yang. *Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats*. *Pharmacological Research* 2006, 53: 303–309.
- 77) M. Yaman, O. Eser, M. Cosar, O. Bas, O. Sahin, H. Mollaoglu, H. Fidan, A. Songurc. *Oral Administration of Avocado Soybean*

- 
- Unsaponifiables (ASU) Reduces Ischemic Damage in the Rat Hippocampus*. Archives of Medical Research 2007, 38: 489-494.
- 78)** Y. Zheng, J. Liu, J. Wang, L. Xu. *Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia*. Brain Research 2007, 1138: 86-94.
- 79)** T. Tsubokawa, V. Jadhav, I. Solaroglu, Y. Shiokawa, Y. Konishi, J. Zhang. *Lecithinized superoxide dismutase improves outcomes and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats*. Stroke 2007, 38: 1057-1062.
- 80)** C. Wang, D. Zhang, G. Li, J. Liu, J. Tian, F. Fu, K. Liu. *Neuroprotective effects of saffor yellow B on brain ischemic injury*. Experimental Brain Research 2007, 177: 533-539.

---

**9- ABREVIATURAS:**

ACM:	Arteria cerebral media.
ADN:	Acido desoxirribonucleico.
AMPA:	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico
ASB:	Albúmina Sérica Bovina.
ATP:	Adenosin Trifosfato.
BCCAO:	Oclusión bilateral de la arteria carótida común.
CAT:	Catalasa.
DGA:	Diacilglicerol.
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
ER:	Especies reactivas.
ERN:	Especies reactivas de nitrógeno.
ERO:	Especies reactivas de oxígeno.
EVC:	Enfermedad Vascular Cerebral.
GPx:	Glutación Peroxidasa.
GR:	Glutación Reductasa.
GSH:	Glutación Reducido.
GSSG:	Glutación oxidado.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de Hidrógeno.
IP <sub>3</sub> :	Inositol trifosfato.
KA:	Kainato.
LCRa:	Líquido cefalorraquídeo artificial.
MDA:	Malondialdehido.
NBT:	Nitroazul de tetrazolio.

---

NADH:	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido.
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
NO:	Óxido Nítrico.
$O_2^{\cdot-}$ :	Anión superóxido.
OH•:	Radical Hidroxilo.
ONOO <sup>-</sup> :	Peroxinitrito.
OPT:	o-ftalaldehído.
POG:	Privación de oxígeno y glucosa.
SOD:	Superóxido Dismutasa
TTC:	Cloruro de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolio.
TBARS:	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.