

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENFASIS EN NEUROCIENCIAS

Efectos de la administración de N-acetilcisteína intrararterial en reperfusión post isquémica sobre la expresión de proteínas PDI y ERp57, Malonil dialdehído, y marcadores cualitativos de apoptosis, en médula espinal de ratas

Miguel Enrique Berbeo Calderón

Director de Trabajo de Grado:

Dr. Sergio Hernandez, MD.

Bogotá, Enero de 2010

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENFASIS EN NEUROCIENCIAS

Efectos de la administración de N-acetilcisteína intrarterial en reperfusión post isquémica sobre la expresión de proteínas PDI y ERp57, Malonil dialdehído, y marcadores cualitativos de apoptosis, en médula espinal de ratas

Miguel Enrique Berbeo Calderón

APROBADO

Dra. Adriana Cuéllar
Jurado

Dr. Carlos Castro
Jurado

Dr. Juan Carlos Puentes
Jurado

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a

- A los Profesores de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana por brindarme su apoyo, y mostrarme una manera diferente de interpretar el conocimiento
- Al Dr. Sergio Hernández Vela, Director de este Trabajo de Grado, por su compromiso y su ayuda hasta el final
- Al Dr. Iván Solarte Rodríguez, Decano Académico de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo incondicional durante mis estudios y la ejecución del Trabajo de Grado
- Al Dr. Jairo Tovar, por brindarme sus conocimientos y sus valiosos consejos
- A mis amigos y compañeros de trabajo, especialistas y residentes, en el Departamento de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, por su paciencia, por su apoyo, y por darme ideas todo el tiempo
- A todas las demás personas que me ayudaron desinteresadamente para lograr esta meta.

*Dedico especialmente este Trabajo de Grado
a mi amada esposa Angela María
quien con su amor, su ejemplo, y sus consejos, es el
motor principal de todos mis proyectos de vida*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCION	9
OBJETIVOS	12
1. MARCO TEORICO	13
1.1 ISQUEMIA EN EL TEJIDO NERVIOSO	13
1.2 REPERFUSION	17
1.3 PRODUCCION DE RADICALES LIBRES EN ISQUEMIA	19
1.4 PEROXIDACION LIPIDICA EN REPERFUSION POST ISQUEMICA	20
1.5 ANTIOXIDANTES	22
1.6 EXPRESION DE LAS PROTEINAS CHAPERONAS DE LA FAMILIA PROTEIN DISULFURO ISOMERASA EN ISQUEMIA	23
1.6.1 FUNCIONES DE LAS PDI	25
1.7 N-ACETILCISTEINA	27
2. METODOLOGIA	29
2.1 ANIMALES	29
2.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	29
2.3 PROCEDIENDO QUIRURGICO	29
2.4 ADMINISTRACION DE N-ACETILCISTEINA	31
2.5 OBTENCION DEL TEJIDO MEDULAR PARA INMUNOCITOQUIMICA	31
2.6 DETERMINACION POR INMUCITOQUIMICA E INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS PROTEINAS PDI Y ERp57	31
2.7 EVALUACION HISTOLOGICA DE LOS CORTES DE MEDULA ESPINAL	32
2.8 DETERMINACION DE LA CONDENSACION DE CROMATINA EN CORTES DE MEDULA ESPINAL	33
2.9 OBTENCION DE PROTEINAS DE MEDULA ESPINAL	33

2.10 ELISA	34
2.11 ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT	35
2.12 CUANTIFICACION DE LA PRODUCCION DE MALON DIALDEHIDO	35
2.13 ANALISIS ESTADISTICO	36
3. RESULTADOS	37
3.1 DETERMINACION POR INMUNOCITOQUIMICA E INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS PROTEINAS PDI Y ERp57	37
3.2 DETERMINACION DE LA CONDENSACION DE CROMATINA EN CORTES DE MEDULA ESPINAL	42
3.3 DETERMINACION POR WESTERN BLOT Y ELISA DE LAS PROTEINAS PDI Y ERp57	46
3.4 ANALISIS DE LA CONDENSACION DE CROMATINA E INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS PROTEINAS PDI Y ERp57 EN CORTES DE MEDULA ESPINAL PERMEABILIZADAS CON TRITON X.100 AL 5% DURANTE 90 MINUTOS	48
3.5 EVALUACION HISTOLOGICA DE LOS CORTES DE MEDULA ESPINAL	49
3.6 CUANTIFICACION DE LA PRODUCCION DE MALON DIALDEHIDO	49
3.7 ANALISIS DESCRIPTIVO	51
4. DISCUSION	52
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

RESUMEN

En la enfermedad vascular isquémica del tejido nervioso, en el trauma, y en hipertensión intracraneana en general, la suspensión del flujo sanguíneo al tejido es el marcador pronóstico de mayor importancia. Por esta razón, los esfuerzos terapéuticos están encaminados a minimizar la duración de la isquemia y restaurar el aporte de oxígeno. De forma similar, en diversos procedimientos quirúrgicos puede ser necesario ocluir transitoriamente arterias nutricias del tejido nervioso y privarlo del flujo sanguíneo. Algunos de estos procedimientos quirúrgicos son las cirugías de aneurismas de las arterias cerebrales, y las cirugías de los aneurismas de la arteria aorta torácica o abdominal. En estos últimos, puede haber lesión de las arterias de la médula espinal. Al restaurar el flujo sanguíneo (fenómeno de reperfusión), hay un nuevo aporte de oxígeno que desencadena eventos fisiológicos y químicos que pueden empeorar el daño de los tejidos. Entre los procesos bioquímicos que ocurren durante la reperfusión post isquémica se encuentra la activación de proteínas chaperonas como la familia de las Protein Disulfuro Isomerasas (PDI), la formación de radicales libres como el ion superóxido, el peróxido de hidrógeno, y el peroxinitrito, así como también la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares que puede llevar a la muerte celular. Dependiendo del grado de lesión de algunas organelas intracelulares, específicamente la mitocondria, la muerte de la célula se dará por necrosis o por apoptosis.

En todas las células existen mecanismos antioxidantes que controlan la producción normal de radicales libres. Sin embargo, durante la isquemia estos mecanismos se agotan y son insuficientes en la reperfusión post isquémica. La pérdida del balance entre el nivel de radicales libres y el nivel de antioxidantes naturales es definida como Estrés Oxidativo. La N-acetilcisteína (NAC) es un medicamento usado como agente mucolítico y también se ha demostrado ampliamente su capacidad reductora. Se conoce que la N-acetilcisteína además es precursora del glutatión y de la glutatión peroxidasa, dos poderosas sustancias antioxidantes endógenas. En este trabajo se estudian los efectos de la administración intrarterial de N-acetilcisteína sobre la expresión de

marcadores cualitativos de apoptosis, el producto de la peroxidación lipídica malonildialdehido (MDA), y sobre las proteínas chaperonas PDI y ERp57, en reperfusión post isquémica en médula espinal en ratas.

ABSTRACT

The suspension of blood flow to tissues is the most important prognostic factor related to outcome in conditions such as ischemic cerebrovascular disease, traumatic brain injury and intracranial hypertension in general. For this reason, therapeutic targets are aimed at decreasing time of ischemia and increasing oxygen delivery. During some surgical procedures like cerebral or thoracic and abdominal aneurysm surgery, it may be required to temporarily clamp a vessel, depriving tissue from normal blood flow. Some of the most commonly compromised vessels during abdominal vascular surgery are those supplying the spinal cord; when restoring blood flow (reperfusion phenomenon), the new oxygen load can unleash a series of physiological and biochemical events which can ultimately lead to tissue injury. Some of these events include the formation of chaperone proteins like Disulfide Isomerases (PDI), free radical formation (superoxide anion, hydrogen peroxide and peroxynitrite) and membrane lipid peroxidation, all of which can lead to cell death. Depending on the degree of organelle damage, (especially the mitochondria) will the cell die from necrosis or programmed apoptosis.

Every cell has protective mechanisms against the formation of free radicals. Nevertheless, during ischemia, these mechanisms run out and quickly become insufficient during tissue reperfusion; this imbalance has been termed Oxidative Stress. N – Acetylcysteine is a medication used as a mucolytic agent, but has also proven to have reductive capacities. It is also known that this molecule is a precursor in the formation of glutathione and glutathione peroxidase, two powerful endogenous anti oxidant substances. The present study aims to determine the effect of the intra arterial injection of N – Acetylcysteine over the expression of qualitative apoptosis markers Malonylaldehyde (a lipid peroxidation marker) and PDI - ERp57 chaperone proteins, in a model of post ischemic reperfusion in rat spinal cord.

INTRODUCCION

La isquemia es la disminución del flujo sanguíneo de cualquier órgano a un punto en donde se compromete su normal funcionamiento. Si la isquemia se prolonga más allá de los límites de tiempo tolerables para cada tejido, o si la disminución del flujo sanguíneo excede los requerimientos mínimos, se compromete la supervivencia del tejido. El tejido nervioso es especialmente sensible a la isquemia y la médula espinal no es la excepción. Durante algunas intervenciones quirúrgicas como el clipaje de aneurismas cerebrales y el tratamiento de aneurismas de la aorta toracoabdominal, es necesario en ocasiones realizar la oclusión transitoria de una arteria lo que bloquea el flujo sanguíneo hacia determinada zona del tejido nervioso. Esto conlleva a la falta de oxígeno en las áreas tisulares no irrigadas. Tras suspender la oclusión viene la reperusión en la cual el flujo sanguíneo se restituye. Al iniciarse la irrigación hay una gran suplenencia de oxígeno para las células y éste constituye el sustrato principal para la síntesis de especies reactivas de oxígeno o radicales libres. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que están implicadas en la patología asociada a isquemia tisular y otras enfermedades como el trauma, los tumores, la hipertensión endocraneana, etc., a través de un proceso conocido como estrés oxidativo, el cual finalmente, puede llevar a la muerte celular. Los radicales libres se forman como un producto de la cadena respiratoria y de otros procesos metabólicos normales intracelulares, pero en algunos casos en los cuales los procesos bioquímicos celulares normales se ven alterados, la célula produce más radicales libres o la contraparte antioxidante no es suficiente para contrarrestar su efecto deletéreo. Adicionalmente, existen otros sitios de producción de radicales libres como la superficie de los polimorfonucleares y de los macrófagos activados, así como también en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Estas últimas también son afectadas por el fenómeno de isquemia/reperusión.

Otro aspecto de una respuesta adaptativa y de regeneración en el tejido nervioso a la isquemia incluye la inducción de las proteínas chaperonas como las pertenecientes a la familia de las Proteín Disulfuro Isomerasas (PDI,

ERp57), cuya expresión se aumenta tras períodos de isquemia por vías de señalización desencadenadas por el aumento en la producción de radicales libres. Al producirse la isquemia y posterior reperfusión, por medio de la producción de radicales libres y otros eventos moleculares, se induce la denaturalización de proteínas. Las proteínas denaturadas activan factores de transcripción, entre ellos el factor inducido por hipoxia (HIF) lo que lleva a la activación de las chaperonas.

El daño por isquemia en la médula espinal es una entidad muy común y con efectos devastadores en la práctica clínica. Una proporción significativa de casos ocurre después de las operaciones de la aorta descendente torácica o toracoabdominal, y la isquemia en la médula espinal puede también representar un importante mecanismo de daño después de trauma. Durante este tipo de cirugías es necesario ocluir transitoriamente la arteria o arterias de la cual nace el aneurisma para poder realizar la disección del cuello de la lesión y al liberar o al retirar el elemento ocluidor se realiza la reperfusión. La reperfusión post isquémica conduce al desencadenamiento de una cascada de eventos moleculares que llevan a la expresión de varios genes y sus proteínas que pueden provocar la muerte celular. Este es un proceso que se instaura desde los primeros minutos de iniciada la isquemia y se ha observado que durante la reperfusión se logra la restauración del aporte de oxígeno y nutrientes a las células isquémicas, aunque existe riesgo de generar sustancias deletéreas para el tejido como los radicales libres que pueden aumentar su producción durante la reperfusión.

Entre las vías de señalización que desencadena la reperfusión post isquémica se encuentran aquellas mediadas por el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) el cual en ausencia de oxígeno se trasloca al núcleo, donde, unido al HIF-1b, actúa como factor transcripcional de genes HRE (Elementos de Respuesta Hipóxica). Estos regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas, que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadoras hasta hormonas involucradas en la regulación a escala del organismo de la circulación y la eritropoyesis. Entre las alteraciones de importancia fisiopatológica, que involucran al sistema de HIF-1, se incluyen: la isquemia/reperfusión, la

enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la adaptación al tabaco/humo, anemia/hemorragia, crecimiento, vascularización y resistencia celular de los tumores, preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado, hiper o hipovascularización retiniana, sobredosis de fármacos, enfermedad inflamatoria intestinal y curación de heridas. El factor HIF induce la expresión de proteínas chaperonas como las pertenecientes a la familia protein disulfuro isomerasa (PDI) la cual ayuda al plegamiento correcto de las proteínas mediante formación de puentes disulfuro.

Debido al aumento en la producción de radicales libres durante la reperfusión post isquémica, se han utilizado varias aproximaciones experimentales que incluyen la administración de sustancias antioxidantes con el fin de disminuir el efecto deletéreo de estas moléculas. Entre estas sustancias se encuentra la N-acetilcisteína (NAC), la cual es una molécula reductora y precursora del glutatión, lo que potencia su actividad antioxidante. Con base en lo observado en la práctica clínica, existe una gran necesidad de contrarrestar los efectos deletéreos de la reperfusión post isquémica del tejido nervioso ya que, de no hacerlo, se aumenta la probabilidad de la aparición de déficit neurológico de menor o mayor grado en los pacientes. Adicionalmente, es necesario minimizar el impacto psicosocial y económico del déficit neurológico secundario a la isquemia.

La importancia de este trabajo radica en la evaluación que se hace del poder reductor de la N-acetilcisteína para atenuar los efectos deletéreos de la reperfusión post isquémica a nivel de peroxidación lipídica, expresión de indicadores cualitativos de apoptosis, y de las proteínas chaperonas PDI y ERp57 en médula espinal en ratas.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar los efectos de la administración de N-acetilcisteína intrarterial sobre la expresión de las proteínas chaperonas PDI, ERp57, la presencia de marcadores cualitativos intracelulares de apoptosis, y la peroxidación lipídica en reperfusión post isquémica de médula espinal en ratas.

ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica microquirúrgica de la isquemia transitoria de la médula espinal en ratas mediante la oclusión de la arteria aorta abdominal infrarenal.
2. Estandarizar la técnica microquirúrgica de la reperfusión post isquémica medicada y no medicada de la médula espinal en ratas, luego de la oclusión de la arteria aorta abdominal infrarenal.
3. Determinar el efecto de la N-acetilcisteína intra arterial en reperfusión post isquémica sobre la presencia de las chaperonas PDI y ERp57 en médula espinal en ratas.
4. Determinar el efecto de la N-acetilcisteína intra arterial en reperfusión post isquémica en la expresión cualitativa de marcadores intracelulares de apoptosis en médula espinal en ratas.
5. Determinar el efecto de la N-acetilcisteína intra arterial en reperfusión post isquémica sobre la peroxidación lipídica en médula espinal en ratas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ISQUEMIA EN EL TEJIDO NERVIOSO

La isquemia se define como un proceso en el cual un tejido o parte de él pierde la suplencia de sangre y por consiguiente de oxígeno (1). La isquemia en general es un fenómeno común que subyace a la gran mayoría de las lesiones que afectan al tejido nervioso, ya sea por oclusión directa de la luz de los vasos sanguíneos por trombos o émbolos, por compresión como ocurre en el caso de los tumores, los abscesos, las fracturas de las vértebras, y las colecciones hemáticas asociadas al trauma, o por espasmo de los vasos sanguíneos secundario a señales químicas de los procesos inflamatorios que acompañan a estas y otras lesiones. El daño isquémico del tejido nervioso por oclusión directa de sus vasos nutricios por enfermedades comunes como la Hipertensión Arterial y la Diabetes, es muy frecuente y altamente prevalente en los seres humanos después de los 60 años, con efectos devastadores en la práctica clínica (2). En la médula espinal, una proporción significativa de casos ocurre después de las operaciones de la aorta descendente torácica o toracoabdominal. Adicionalmente, la isquemia en la médula espinal puede también representar un importante mecanismo de daño después de trauma (2). La isquemia medular puede ser aguda o crónica, y la isquemia aguda, a su vez, puede ser focal (accidentes isquémicos, infarto venoso), o global (paro cardiocirculatorio, hipotensión profunda) (3). La evaluación del daño en la médula espinal se ha enfocado en la sustancia gris como un posible blanco de un agente terapéutico, ya que la sustancia blanca es menos vulnerable al daño por isquemia (4). Sin embargo, la evaluación solamente de la sustancia gris no es un indicador suficiente del daño en médula espinal y por lo tanto, debe evaluarse tanto la sustancia gris como la blanca (4).

Desde hace muchos años se sabe que existe una relación entre la estenosis del canal raquídeo (estrechamiento de los espacios en la columna que provocan la compresión de los nervios o de la médula) (5) y el desarrollo de parálisis en las patas posteriores en perro (2). Para estudiar el daño causado por isquemia en médula espinal se han desarrollado algunos modelos

animales, por ejemplo, el modelo en conejo que ha sido sistemáticamente caracterizado por Kanellopoulo (2). En este modelo se puede producir paraplejía interrumpiendo temporalmente el flujo sanguíneo de la aorta infrarenal. Sin embargo, el sistema arterial de la médula espinal en el conejo es segmentario y por lo tanto, es diferente del sistema arterial del humano. En contraste, algunos estudios han mostrado que la anatomía vascular de la médula espinal en ratas y humanos es casi idéntica (2) y el daño por isquemia en médula espinal ha sido producido en ratas por clampeo del arco de la aorta.

El mecanismo de paraplejía post operatoria involucra tanto isquemia aguda como daño por reperfusión. Se han realizado algunas aproximaciones experimentales para proteger la médula espinal contra el daño por isquemia/reperfusión como la hipotermia, el drenaje de líquido cefalorraquídeo, administración de antagonistas del receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), el uso de bloqueadores de los canales de calcio y de barredores de radicales libres (4). Sin embargo, debido a que su eficacia ha sido limitada, es necesario desarrollar más investigaciones sobre los mecanismos de daño por isquemia/reperfusión en médula espinal con el fin de identificar otros agentes terapéuticos (4).

La mayoría de la energía metabólica de las neuronas se gasta en mantener los gradientes iónicos a través de las membranas celulares. La bomba de sodio/potasio mantiene el potasio extracelular bajo y el sodio extracelular alto, comparados con sus concentraciones intracelulares. Esta bomba funciona gracias a la energía liberada por la hidrólisis del Adenosín Trifosfato (ATP) que se fabrica en las mitocondrias. La mayor parte de la energía generada en la mitocondria (ATP) requiere oxígeno, pero en la ausencia de oxígeno para la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria, la producción neta de ATP a partir de glucosa, hasta su conversión en piruvato, es de solo dos moléculas. La liberación del fosfato a partir del ATP produce ADP (Adenosina difosfato) e hidrógeno. En el primer minuto luego de la suspensión del flujo sanguíneo al tejido nervioso, el ATP se regenera a partir de ADP y de donadores de grupos fosfato por la fosfocreatina. Dentro de dos minutos sin flujo sanguíneo (ya sea por paro cardíaco o por oclusión de algún vaso sanguíneo) la neurona ya no

tiene energía para el funcionamiento de la bomba de sodio/potasio. Los iones de potasio salen de la célula y los de sodio y cloro entran a la célula a medida que la membrana se despolariza. El resultado neto es la acumulación de ADP, AMP (adenosina monofosfato), fosfato, y lactato. El exceso de dióxido de carbono lleva a la acumulación de ácido carbónico (H_2CO_3) que aumenta la acidez del medio. En dos minutos de isquemia, el pH extracelular puede caer hasta valores de 6.7. Otra bomba dependiente de ATP ayuda a mantener la concentración del calcio extracelular cerca de 10000 veces más alta que dentro del citoplasma de la célula.

La despolarización isquémica de las neuronas libera gran cantidad de glutamato. En las neuronas postsinápticas existen diferentes tipos de receptores de glutamato, especialmente del tipo NMDA y AMPA, que son básicamente canales de calcio. En consecuencia, la liberación excesiva de glutamato resulta en la entrada excesiva de calcio en las neuronas, fenómeno conocido como excitotoxicidad. En condiciones de alta demanda metabólica y de adecuada disponibilidad de oxígeno, la entrada de calcio a la mitocondria puede aumentar la producción de ATP mediante la estimulación de tres enzimas del ciclo de Krebs (piruvato deshidrogenasa, alfa-cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasas). Pero cuando el oxígeno no está disponible en cantidades adecuadas para aceptar electrones (átomos de hidrógeno) del NADH, el exceso de electrones forma superóxido a partir del oxígeno residual. El aumento de calcio dentro de la mitocondria en estas condiciones termina por alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, reduce el potencial de protones, edematiza la matriz mitocondrial y finalmente libera citocromo c que actúa como iniciador de apoptosis. Los altos niveles de calcio intracelular también activan fosfolipasas que atacan los fosfolípidos de las membranas y causan la liberación de ácido araquidónico. (Figura 1, página siguiente).

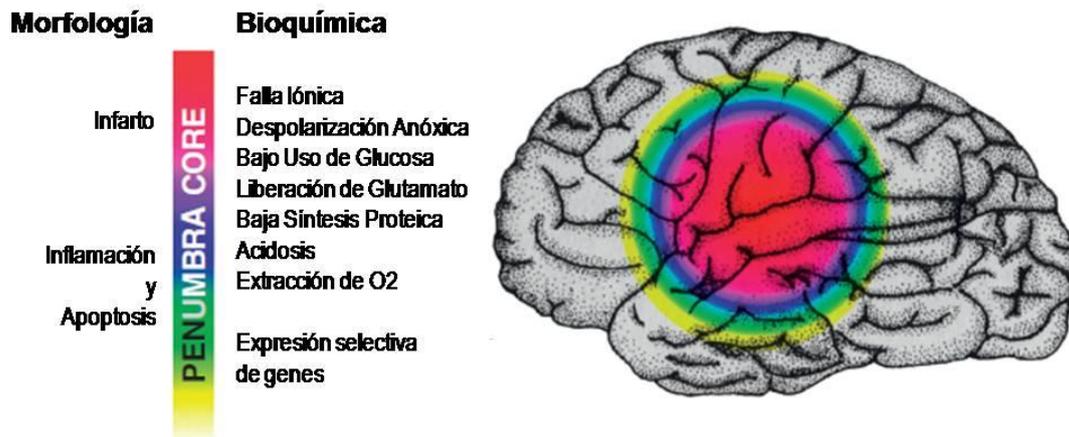


Figura 1. La Penumbra Isquémica. Una región cerebral de baja perfusión en la que las células han perdido su potencial de membrana en forma definitiva ("core") está rodeada por una zona en la que la perfusión es limitrofe. Modificado de ref. 44.

La porción lipídica de las membranas celulares es la que sufre el mayor daño en la isquemia, a través de la activación de fosfolipasas y peroxidación lipídica. La isquemia cerebral produce una rápida liberación de ácidos grasos, especialmente ácido araquidónico debido a la acción de enzimas fosfolipasas. La entrada del calcio en la célula después de unos pocos minutos de isquemia activa a la Fosfolipasa A₂ dependiente de calcio (cPLA₂). La cPLA₂ libera preferencialmente ácido araquidónico, el cual está presente en grandes cantidades en las células del tejido nervioso. La lipoxigenasa forma hidroperóxidos de lípido (ROOH) lo cual puede conducir a peroxidación lipídica por reacciones tipo Fenton (6).

La disminución de la actividad energética de las neuronas y el daño de las membranas reduce la captación de glutamato y empeora la citotoxicidad. Pronto, la lesión de la membrana celular es tan grande que el mayor mecanismo de liberación de glutamato es su salida directa a través de la membrana de la célula (7).

1.2 REPERFUSIÓN

Si después de un periodo de isquemia focal o global se restituye el flujo sanguíneo, las células son nuevamente irrigadas y reciben una cantidad significativa de oxígeno (8). A partir de los modelos animales y de los estudios en humanos, se ha podido determinar que la lesión por reperfusión es el principal factor promotor del estrés oxidativo en las zonas de las lesiones isquémicas (8, 9). Sin embargo, actualmente la reperfusión temprana se acepta como una opción terapéutica. El daño inducido por la reperfusión siempre va precedido por la alteración celular provocada por el periodo isquémico, seguido de cambios enzimáticos y metabólicos que facilitan los mecanismos fisiopatológicos de la lesión (9), así como también por la producción y liberación de radicales libres (10).

En la reperfusión hay un considerable daño en las membranas de las células del endotelio vascular, plaquetas, leucocitos y otras células del torrente sanguíneo. Los neutrófilos activados producen el anión superóxido, el cual por acción de la superóxido dismutasa (SOD) se transforma en peróxido de hidrógeno. Adicionalmente, la enzima neutrófilo mieloperoxidasa convierte el peróxido de hidrógeno a ácido hipocloroso. Este ácido reacciona con el superóxido produciendo radicales hidroxilo (11). Los eicosanoides generados por el ácido araquidónico (especialmente los leucotrienos) incrementan la adhesión de los leucocitos y plaquetas a las paredes de los capilares. El anión superóxido también incrementa la adhesión de los leucocitos a las paredes de los vasos. Los eicosanoides están asociados al efecto que tienen los radicales libres al hacer las paredes de los vasos más permeables, causando edema del tejido nervioso lo que lleva al estrechamiento de los capilares. La disminución del ATP también reduce significativamente la capacidad de los eritrocitos de deformarse (18). Asimismo, se presenta edema de las células endoteliales. Todo este proceso constituye el fenómeno de “no reflujo” en el que a pesar de la restitución del flujo sanguíneo, puede persistir la oclusión de algunos vasos sanguíneos distales, empeorando los cambios isquémicos en algunas zonas, y generando lesión por reperfusión en otras. El acto de restaurar el flujo sanguíneo después de más de 10 minutos de isquemia resulta típicamente más

perjudicial que la isquemia por si misma ya que la isquemia establece las condiciones en las que la reposición del oxígeno va a generar radicales libres más que contribuir a la producción de energía celular (12).

Durante el periodo de isquemia hay una acumulación de ácido láctico el cual disminuye el pH celular. Las neuronas usan un intercambiador de Na^+/H^+ para eliminar el exceso de protones, pero en el proceso se acumula Na^+ el cual no puede ser exportado con la bomba de sodio/potasio debido a la deficiencia de ATP. Como consecuencia las células usan el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, el cual carga a la célula con Ca^{+2} . Tras la reperfusión el calcio entra a la mitocondria, pero la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna puede mantenerse dado que la acidez del medio por la isquemia mantiene cerrados los Poros de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP). La elevación del pH con la reperfusión puede abrir el MPTP y liberar Citocromo C. Si esta apertura es transitoria por la nueva disponibilidad de ATP, la célula morirá por apoptosis. Pero si el MPTP permanece abierto por insuficiente ATP, la neurona morirá por necrosis (13).

El exceso de NADH en la reperfusión reacciona con el oxígeno que está siendo introducido para producir superóxido. El superóxido reacciona con el hierro y azufre presentes en las proteínas disminuyendo su actividad y liberando hierro libre, el cual causa la formación del radical hidroxilo (Reacción de Fenton). El óxido nítrico en la mitocondria reacciona con el superóxido tres veces más rápido que la enzima superóxido dismutasa (SOD), lo que resulta en la formación de un radical libre más potente: el peroxinitrito (14). El peroxinitrito inactiva de manera irreversible no solamente a la enzima SOD, si no también a los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial.

Hay una correlación lineal entre la severidad de la lesión por reperfusión y la disrupción de la Barrera Hemato Encefálica (BHE). El flujo de agua hacia el tejido cerebral debido a la lesión de la BHE produce edema. Un daño mayor de la BHE puede transformar un evento isquémico en un evento hemorrágico. Las proteasas son enzimas que degradan proteínas y son liberadas durante la isquemia. La Metaloproteinasa de la Matriz-13 (MMP-13, una colagenasa), se

origina temprano en la isquemia y tiene un efecto corrosivo en la BHE (15). Los leucocitos, probablemente neutrófilos, activados por la inflamación generada por la isquemia, liberan cantidades crecientes de MMP-9 (gelatinasa-B) que también degrada la BHE (16). Sin embargo, la reperfusión puede activar específicamente la MMP-2 (gelatinasa A), la cual aumenta la permeabilidad capilar y el sangrado, en adición a la apertura de la BHE (17). (Figura 2).

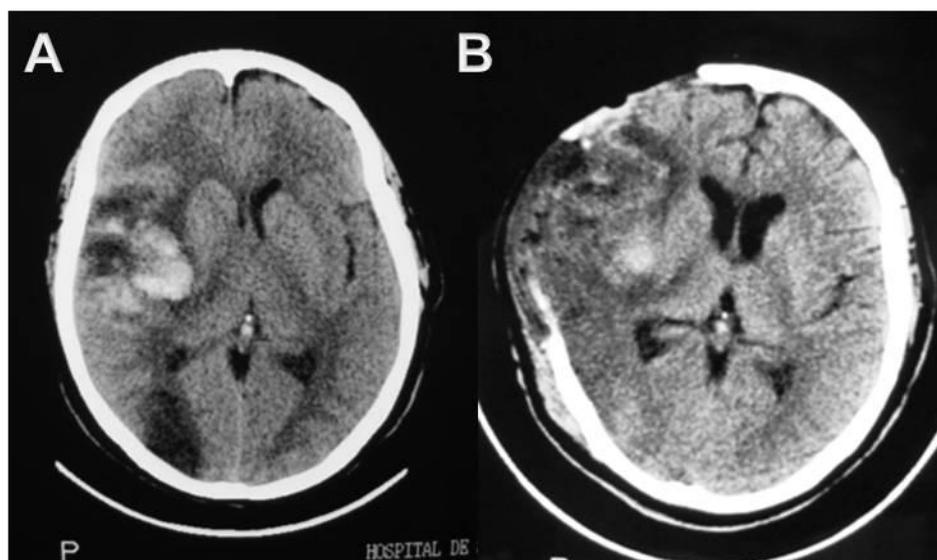


Figura 2. Transformación hemorrágica de un infarto de arteria cerebral media (A), con gran recuperación aparente de la zona isquémica luego de realizar una craniectomía descompresiva (B). (Archivo personal).

1.3 PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN ISQUEMIA

Tras periodos de isquemia/reperfusión en cualquier tejido se aumenta la producción de radicales libres. Los radicales libres de oxígeno (ROS por sus iniciales en inglés) han sido implicados en el desarrollo de muchos desórdenes neurológicos y disfunciones cerebrales (19,20). Un papel de los radicales libres en el daño neurológico involucra la reperfusión después de isquemia. Durante un periodo de isquemia agudo o crónico, el flujo sanguíneo y el aporte de oxígeno están significativamente disminuidos en las regiones del tejido que son suplidas por el vaso ocluido. La reoxigenación durante la reperfusión provee oxígeno para sostener la viabilidad celular y también provee oxígeno utilizado

como sustrato de numerosas reacciones de oxidación enzimática que pueden llevar a la producción excesiva de oxidantes altamente reactivos (20, 21). Normalmente, la producción constante de radicales libres en las mitocondrias es contrarrestado por las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Otros antioxidantes, incluyendo el glutatión, ácido ascórbico y vitamina E están también involucrados en la detoxificación de los radicales libres.

Se conoce entonces que el estrés oxidativo se presenta cuando hay un desbalance entre los oxidantes y los antioxidantes, y se asume que este balance juega un papel importante en condiciones fisiológicas como el envejecimiento y la patología de una gran variedad de enfermedades (22). Entre estas se encuentran enfermedades a nivel cardiovascular, hepático, respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar), renal (falla renal terminal, nefropatía crónica por aloinjerto) y neurológico (23, 24, 25, 26, 27, 28). En isquemia y reperfusión, el cambio rápido en la presión parcial de oxígeno es la principal adaptación al estrés. El daño por isquemia/reperfusión está acompañado por una importante tasa de morbi/mortalidad y este daño tiene que ver con factores inflamatorios activados por los ROS como el factor de transcripción NF- κ B el cual lleva a la expresión de TNF- α y a la generación de otras citoquinas pro inflamatorias (22). Durante la reperfusión, la perturbación de los mecanismos de defensa antioxidante se da como resultado de la sobreproducción de radicales de oxígeno, inactivación de sistemas de detoxificación, agotamiento de antioxidantes y falla en una adecuada suplencia de antioxidantes en el tejido nervioso isquémico (20, 29).

1.4 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN REPERFUSIÓN POST ISQUÉMICA

Los radicales libres que se generan al restaurar el flujo sanguíneo después de un periodo isquémico pueden reaccionar con biomoléculas que forman las células. Los aniones superóxido tienden a concentrarse en la mitocondria debido a que son muy reactivos para viajar lejos, y son encontrados con menor frecuencia en el núcleo que en el citoplasma. De manera similar, los radicales

hidroxilo no se alejan mucho de su sitio de formación. Pero las moléculas de peróxido de hidrógeno son más estables y pueden difundir a través de la membrana nuclear o cerca de la membrana celular. Allí se encuentran con iones de metales pesados y se generan radicales hidroxilo. La reactividad de un radical libre va acorde con su vida media. Una vida media corta se corresponde con una alta reactividad. La vida media de un nanosegundo del radical hidroxilo indica una muy alta reactividad que se hará efectiva rápidamente con moléculas que le son afines. Entre estas biomoléculas se encuentran los lípidos, los cuales son altamente susceptibles a la oxidación (30). La mayoría de estos lípidos presentes en las membranas celulares son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs polyunsaturated fatty acids), los cuales son blanco de los radicales libres (30). La destrucción oxidativa de los PUFAs se conoce como peroxidación lipídica y es particularmente destructiva por ser una reacción en cadena; es decir cuando un ácido graso sufre este tipo de oxidación, se convierte en un radical lipídico y reacciona con un ácido graso vecino para volver a su estado reducido, oxidándolo. Este proceso de no ser detenido por la maquinaria antioxidante celular puede provocar daño en la membrana y la muerte celular (Figura 3) (30).

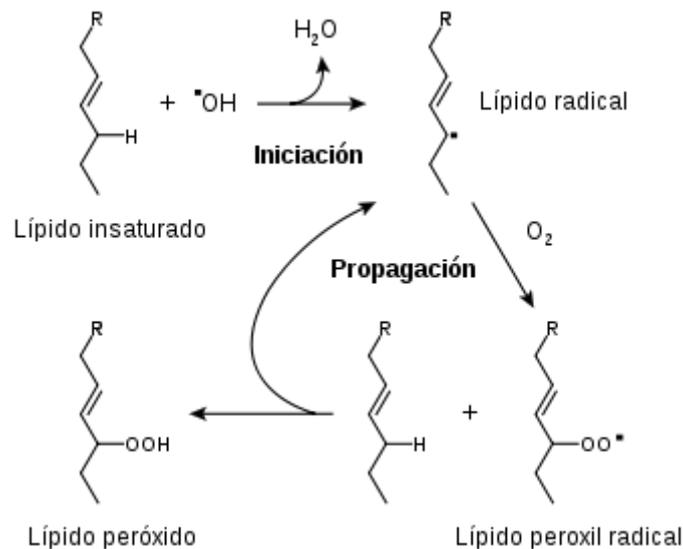


Figura 3. Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos que conforman las membranas celulares poseen enlaces insaturados los cuales son blanco de la acción de los radicales libres. Tomado de (33)

La reperfusión post isquémica dispara la peroxidación lipídica que participará en el daño neuronal (31). Se conoce que el tejido nervioso parece proveer un ambiente especialmente ávido para la ocurrencia de generación de radicales libres y reacciones incontroladas de peroxidación lipídica. Las razones para esto incluyen un alto contenido de hierro en muchas regiones del tejido nervioso y un alta proporción de fosfolípidos de membrana que contienen PUFAs tales como el ácido linoleico (18:2), ácido araquidónico (20:4), y ácido docosahexaenoico (DHA)1 (22:6*n*-3), que son sensibles a la peroxidación lipídica, y que se liberan de las membranas celulares durante la isquemia. Las membranas peroxidadas pierden sus condiciones de permeabilidad, y se convierten en rígidas, reactivas, y no funcionales. La peroxidación lipídica produce adicionalmente muchos aldehídos dañinos, particularmente Malondialdehído (MDA, propanedial) y 4-Hidroxinonenal (4-HNE). El MDA es un metabolito mayor del ácido araquidónico. El 4-HNE es el más tóxico aldehído conocido producido por la peroxidación lipídica. Es mucho más tóxico que el MDA (31a).

1.5 ANTIOXIDANTES

Las células producen radicales libres a partir del oxígeno y del nitrógeno como resultado del metabolismo normal celular. Ya que estos radicales libres son especies químicas altamente oxidantes y reactivas, las células poseen mecanismos antioxidantes de diferentes tipos. Entre las defensas antioxidantes encontramos enzimas, vitaminas y el glutatión. Las principales enzimas con actividad antioxidante son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. En cuanto a las vitaminas se encuentran la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E (tocoferol). El glutatión, por otro lado es un tripéptido (L-glutamil-L-cisteinil-L-glicina) el cual contiene un grupo sulfhidrilo (-SH) con capacidad reductora. La SOD actúa convirtiendo el radical superóxido en a peróxido de hidrógeno. Esta enzima existe en al menos tres isoformas: Cu/ZnSOD que es citoplasmática, la MnSOD que es mitocondrial, y la EcSOD que es extracelular. El peróxido de hidrógeno a su vez puede ser

descompuesto por catalasa o glutatión peroxidasa (GSHPx) en agua. En el caso de los hidroperóxidos lipídicos (LOOH), la enzima glutatión peroxidasa de fosfolípido (PHGPx) los convierte a alcoholes lipídicos (LOH). Tanto la GSHPx como la PHGPx requieren glutatión reducido para su actividad, el cual es convertido a una forma oxidada (GSSG). La enzima glutatión reductasa (GSHRx) trabaja en concierto con la GSHPx y la PHGPx, y reduce el GSSG a GSH. La glutatión sintetasa produce GSH y se incluye entre las enzimas antioxidantes (34).

La prevención de la producción de radicales libres ha llevado a la promoción de la supervivencia neuronal en algunos modelos animales (35). También se ha observado que el aumento de las moléculas que atrapan los radicales libres como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa mejora la supervivencia neuronal después de isquemia focal (29). Dentro de los estudios en que se ha buscado una molécula antioxidante para neutralizar los radicales libres producidos tras un periodo isquémico se encuentra el uso de la enzima glutatión peroxidasa como una alternativa de un sistema endógeno antioxidante. En un estudio se encontró que el ebseleno es un compuesto que aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa lo que llevó a disminución de los radicales libres producidos (36). En otro los autores encontraron que esta molécula disminuye el tamaño del infarto cortical después de isquemia focal (37). Un compuesto alternativo es la N-acetilcisteína (NAC), la cual ha sido ampliamente utilizada en clínica gracias a sus propiedades reductoras (ver más adelante)

1.6 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CHAPERONAS DE LA FAMILIA PROTEIN DISULFURO ISOMERASA EN ISQUEMIA

Las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) constituyen una familia de enzimas estructuralmente relacionadas (tabla 1), involucradas en el correcto plegamiento de las proteínas, así como también están involucradas en la formación y remodelación de los puentes disulfuro de las proteínas sintetizadas

en el retículo endoplasmático (RE) rugoso e importadas en el lumen de éste para ser secretadas o incorporadas en la membrana celular. Ellas actúan como chaperonas y por ello hacen parte del sistema de control del correcto plegamiento de las proteínas en ese mismo compartimiento subcelular (38).

La proteína PDI (EC 5.3.4.1) fue la primera de la familia identificada como un catalizador de enlaces disulfuro nativos. Al respecto se observó en el análisis de los componentes del lisado de hígado de rata que aumentaba la tasa de reactivación de la ribonucleasa reducida, PDI aceleraba la formación de los correctos puentes disulfuro monitoreados por la recuperación de la actividad enzimática de la ribonucleasa. La familia de las PDIs está presente tanto en procariotes como en eucariotes y es esencial para la viabilidad celular y su expresión está sobrerregulada bajo condiciones de estrés.

TABLA 1. Miembros de la familia de las PDIs en mamíferos

Proteína	Sinónimos	Localización celular
PDI		Retículo endoplasmático (RE), superficie celular, núcleo,
ERp57	ERp60 (calreticulin); ER-60; GRp58; ER-58; ERp58; ERp61; Q2	RE, núcleo, microdominios rafts, superficie celular, citosol, y secretada.
ERp72	CaBP2*	RE, superficie celular y secretada
PDIR		RE
PDIp		RE páncreas
P5	CaBP1*	RE
ERp44**		RE
ERp29***	ERp31; ERp28	RE

*CaBP se indican como miembros de una familia de proteínas que unen calcio

**Esta proteína tiene un único dominio de plegamiento tioredoxin y una secuencia CRFS en el sitio activo tipo tioredoxin.

*** Esta proteína tiene un único dominio de plegamiento tioredoxin y no posee un sitio activo tipo tioredoxin.

Tomada de (38).

1.6.1 Funciones de las PDIs

Función redox isomerasa

La formación de enlaces disulfuro es un evento esencial en el plegamiento de las proteínas. La PDI es capaz de catalizar tanto la oxidación de grupos SH para formar S-S como la reducción de S-S para dar -SH, e isomerizaciones bajo condiciones fisiológicas. La actividad redox y de isomerización de la PDI está dada por la presencia de los dos motivos tioreoxina -CGHC- en los dominios α y α' ; el estado redox del tiol-disulfuro en el sitio activo determina la dirección de la catálisis: la oxidación de un sustrato requiere la conversión de un sitio disulfuro hasta un sitio ditiol; mientras que la reducción de un sustrato requiere la conversión de un sitio activo ditiol a un disulfuro. En cada sitio activo la cisteína NH₂-terminal es expuesta superficialmente y es reactiva hacia el sustrato, formando con éste una mezcla de disulfuros (residuo cisteinil) (39).

Función de chaperona

Además de formar puentes disulfuro, la PDI se une a proteínas sin enlaces disulfuro; esta actividad se denomina función chaperona y es independiente de la función redox-isomerasa; más aún la inactivación del sitio (CGHC) no interfiere en su capacidad de unión. Las interacciones de la PDI con sus sustratos son débiles con $K_d > 100$ M, y dependientes de la longitud y área del esqueleto del sustrato enlazado, en sustratos que contienen residuos cisteína la interacción es mayor debido a la formación de mezclas de disulfuros entre la PDI y el sustrato (40).

Como se mencionó las proteínas de la familia PDI se sobre expresan bajo ciertas condiciones de estrés como la hipoxia y la isquemia. En un estudio (41) los autores demuestran que la PDI es sobre regulada en hipoxia en astrocitos primarios de rata y proponen que la PDI puede ejercer un papel protector haciendo las células más resistentes a los efectos deletéreos causados por la hipoxia e isquemia temporal en corteza cerebral en ratas (41).

Adicionalmente, en otro trabajo (42), los autores muestran que como respuesta a la hipoxia las células sobre regulan la expresión de proteínas del retículo endoplasmático, dos de esas proteínas ya habían sido identificadas como GADPH y la enolasa A. En este artículo los autores demuestran que la otra proteína sobrerregulada como respuesta a la hipoxia, es la proteína PDI lo cual fue evidenciado por microscopía de fluorescencia confocal donde se observó que PDI es sobre regulada significativamente en el citoplasma y presumiblemente en el retículo endoplasmático de células endoteliales durante hipoxia en ratas (42).

Es posible que PDI pueda alterar procesos celulares a través de la regulación de factores de transcripción ya que se conoce que algunos factores de transcripción modifican su afinidad por el DNA cuando cambian las condiciones redox de la célula. Con relación a esto, se ha encontrado PDI en el núcleo de espermatozoides donde esta proteína juega un papel importante en la regulación redox de factores de unión y amplificadores de genes inducidos por interferón (43). Los autores lanzan la hipótesis que a través de la activación del factor inducible por hipoxia (HIF), regulación de otros factores de transcripción y formación de puentes disulfuro, PDI pueda contribuir a la capacidad del retículo endoplasmático de tolerar un estado prolongado de hipoxia.

1.7 N-ACETILCISTEINA

La N-acetilcisteína (NAC) fue introducida como un agente mucolítico para la enfermedad crónica pulmonar hace 50 años. Su efecto se basa en el rompimiento de los puentes disulfuro de las glicoproteínas de alto peso molecular en el moco, lo que lleva a la reducción en la viscosidad (15). Los efectos favorables de la NAC pueden, sin embargo, extenderse mucho más allá de la bronquitis crónica ya que esta molécula tiene una gama muy amplia de propiedades las cuales pueden ser aprovechadas ampliamente en la práctica clínica. Casi todos los efectos benéficos de la NAC se relacionan con su efecto sobre el estrés oxidativo (22). Como se mencionó anteriormente, en las células animales las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas como un

subproducto del metabolismo normal durante la conversión de oxígeno a agua. Los ROS tienen funciones específicas dentro de las células como combatir los microorganismos por los macrófagos y servir como mediadores en diferentes vías de señalización y expresión de genes. Pero estas especies reactivas también pueden causar daño a través de la oxidación de macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA dependiendo de su concentración en la célula (30)

El glutatión (GSH) es el tiol más abundante en las células animales y juega un papel central en la defensa antioxidante contra los ROS. Para la síntesis de glutatión en las células, la suplenencia de cisteína es el determinante limitante y uno de los precursores efectivos de la cisteína es su derivado sintético N-acetilcisteína (22). La NAC puede proveer grupos sulfhidrilo (-SH) y neutralizar radicales libres. Muchos medicamentos y venenos son detoxificados a través de la conjugación con GSH, la cual se provee por administración de NAC (22). Adicionalmente a su función antioxidante, la NAC tiene otros mecanismos de acción, como la inhibición de la activación de neutrófilos, disminución de la adhesión microbial y vasodilatación (22). En el campo de la investigación, la NAC ha sido ampliamente estudiada en varios tipos de patologías (tabla 2) (22).

Research subject	Results
Inflammation, infection, immunity	Attenuating, alleviating, adding resistance, healing and strengthening the immune response, including Leishmania infection and influenza [12, 16–20]
Endothelial cells	Protection against several hazardous factors, including urban air fine particles and tobacco smoke [2, 14, 21]
Vascular wall	Several protective effects [2, 22, 23]
Experimental models of cardiovascular diseases, cardiac surgery	Favourable effects in hypertension, in hypertensive cardiac injury, cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury/myocardial infarct and cardiopulmonary bypass [24–27]
Lungs	Protective effect in injuries by different toxins (including tobacco smoke), in lung transplantation, in lung reperfusion injury, attenuation of pulmonary fibrosis [2, 28–30]
Nervous system	Neuroprotection in transient hypoxic injury (Alzheimer-type) to cortical neurones, prevention of primary sensory neuronal death, beneficial effects in deficits of learning and memory and in hearing loss [31–34]
Gastroenterology	Favourable effect in acute pancreatitis and liver injuries, inhibition of the growth of <i>Helicobacter pylori</i> [2, 11, 35, 36]
Endocrinology/pregnancy	Protection against complications of diabetes, insulin resistance, and oestrogen-deficiency bone loss, restores nitric oxide-mediated effects in the fetoplacental circulation in pre-eclampsia [37–40]
Articular structures	Protection against various injuries [2]
Miscellaneous	Protection against acute high-dose irradiation, photoageing of human skin, decreases plasma total homocysteine levels in healthy volunteers [41–43]

Tabla 2. Tomada de referencia 22.

Desde hace unos años se ha venido experimentando con la administración de NAC antes del evento isquémico en ratas y se ha encontrado una disminución de los efectos deletéreos de la reperfusión post isquémica. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Knuckey y cols. (35) utilizaron la NAC administrada por vía intraperitoneal antes de inducir un evento cerebrovascular en ratas. En este estudio, los autores encontraron que los animales que habían sido tratados con NAC presentaron una disminución significativa en el área y volumen del infarto así como una mejora en los niveles de glutatión y en la evaluación neurológica.

2. METODOLOGÍA

2.1 Animales

En este trabajo se utilizaron ratas machos Wistar (Instituto Nacional de Salud) de 300g aproximadamente. Los animales se mantuvieron en jaulas con comida (Rodentia®) y agua *ad libitum* sometidas a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

2.2 Grupos experimentales

Se incluyeron 6 animales dentro de cada uno de los siguientes grupos:

Grupo 1: Grupo control, animales sin intervención quirúrgica, sin tratamiento con NAC

Grupo 2: Animales con intervención quirúrgica (isquemia) sin tratamiento post isquémico

Grupo 3: Animales con intervención quirúrgica (isquemia) y reperfusión post isquémica con NAC.

Grupo 4: Animales con intervención quirúrgica (isquemia) y reperfusión post isquémica con solución salina

De cada grupo de animales se destinaron 3 animales para perfusión intracardíaca y se realizaron cortes histológicos del tejido medular; los otros 3 animales se sacrificaron por sobredosis de anestésicos, se extrajo la médula espinal y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. A partir de este tejido se determinaron las proteínas de interés por ELISA y western blot (ver más adelante).

2.3 Procedimiento Quirúrgico

Los animales se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) /xilacina (12 mg/ kg). Una vez anestesiados, a cada rata se le afeitó el abdomen y se limpió con iodine. La incisión de la piel se hizo por línea media, xifopúbica (Figura 4). Se disecó el plano muscular y se incidió este plano lateral a la línea media, a la

derecha en todos los casos. Se colocaron separadores y se verificó cuidadosamente la hemostasia. Se identificaron los riñones y las arterias renales. La arteria aorta abdominal se expuso después de la apertura del retroperitoneo. Se separó cuidadosamente de la vena cava inferior. Se colocó un clip para aneurisma con una fuerza de cierre de 50-g (Yasargil FE 693, Aesculap, Germany) en la aorta abdominal distal al nacimiento de las arterias renales por un periodo de 45 min (Figura 5). Para los grupos experimentales 3 y 4, tras los 45 min de isquemia se realizó la perfusión con solución salina (grupo 3) o NAC (grupo 4), y luego se retiró el clip para restaurar el flujo sanguíneo.



Figura 4. Incisión de la piel y del plano muscular

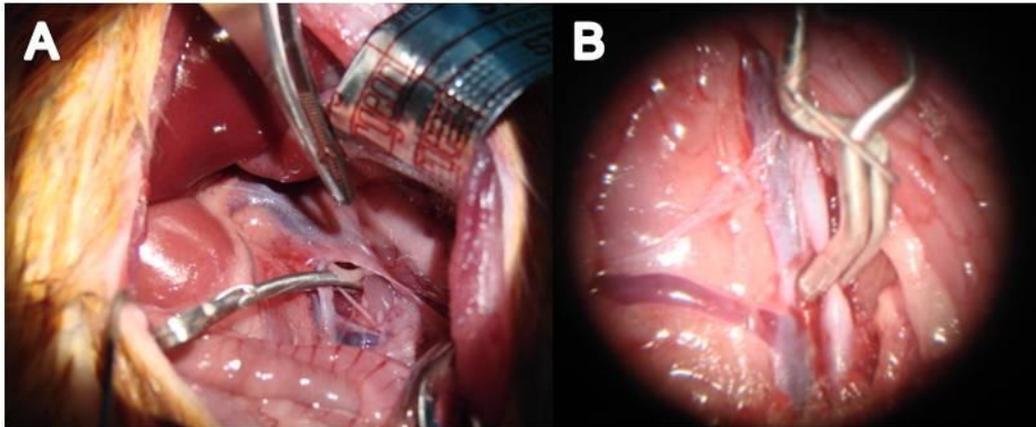


Figura 5. Vista de la disección del retroperitoneo y la colocación del clip en la aorta abdominal por debajo de las arterias renales en (A) y (B) a mayor aumento.

2.4 Administración de N-acetilcisteína

De acuerdo al grupo al que pertenecía el animal se realizó la administración de la NAC (150 mg/kg/dosis) a los 45 min de iniciada la isquemia.

2.5 Obtención del tejido medular para inmunocitoquímica

A las 24 horas de la intervención quirúrgica, los animales se anestesiaron con Tiopental sódico (100mg/kg) y se realizó perfusión transcardíaca con 200 ml de PBS (0.05mol/l) seguido por 200 ml de paraformaldehído al 4%. Se removió la médula espinal y el tejido fue post fijado en paraformaldehído toda la noche a 4 °C y embebido en parafina para los cortes en micrótopo y realizar inmunocitoquímica e inmunofluorescencia (ver más adelante).

2.6 Determinación por inmunocitoquímica e inmunofluorescencia de las proteínas PDI y ERp57.

Para detectar la presencia de las proteínas PDI y ERp57, se realizó la determinación por inmunocitoquímica. Para esto, los cortes histológicos de 8 μ m fueron desparafinados y luego se aplicó PBS-tritón al 1% por 10 min, se

retiró, se lavaron los cortes y se colocó el anticuerpo monoclonal anti-PDI o anti-ERp57 (Santa cruz) en dilución 1:50, se incubaron por una hora a 37°C, se realizaron tres lavados con PBS (Phosphate Buffer Saline) cada uno de 5 min. Se adicionó el anticuerpo secundario antilgG-conjugado con peroxidasa (HRP horseradish peroxidase Santa Cruz) en dilución 1:3000 (Santa Cruz) para inmunocitoquímica. Las láminas para inmunocitoquímica se revelaron utilizando como sustrato aminoetilcarbazol 0,64 mg/ml (AEC) en buffer acetato (acetato de sodio 0,030 M-ácido acético 0.012 M) y peróxido de hidrógeno al 0,36%. El AEC se preparó previamente a 4mg/ml en dimetilformamida; los cortes se incubaron hasta observar células marcadas positivamente por coloración roja. Una vez coloreadas se colocaron en glicerol tamponado, se cubrieron con una laminilla para evitar la deshidratación y poder almacenar las láminas para su posterior análisis en el microscopio de luz.

Para inmunofluorescencia, después de la permeabilización de los cortes se eliminó la fluorescencia basal con cloruro de amonio (50 mM) por 20 min. Se lavó y se incubaron los cortes con anticuerpo primario como para inmunocitoquímica, tras los lavados, se colocó el anticuerpo secundario (FITC-SC2024 Santa Cruz) 1:3000 por 20 min. Esta técnica se modificó dejando los cortes histológicos con Triton X100 al 5% durante 90 minutos. Luego de lavar tres veces se incubó con los anticuerpos y se procedió como se describió antes. Las láminas para inmunofluorescencia se mantuvieron a -20°C protegidas de la luz para el análisis en el microscopio de fluorescencia. Como control se utilizaron cortes en los que no se colocó el anticuerpo primario, pero si el secundario.

2.7 Evaluación histológica de los cortes de médula espinal

Con el fin de determinar los cambios histológicos en el tejido de la médula espinal tras los diferentes tratamientos en los grupos experimentales, los cortes fueron coloreados con hematoxilina-eosina y fueron evaluados por dos patólogos con experiencia en tejido nervioso, previamente entrenados en tejido nervioso de rata. Para mejorar la confiabilidad de los resultados, la evaluación fue ciega en cuanto al grupo de origen de la lámina que se examinaba. Se

planeó tener en cuenta el conteo aproximado de neuronas íntegras y el grado subjetivo de desorganización tisular.

2.8 Determinación de la condensación de la cromatina en cortes de médula espinal.

Con el fin de determinar si la isquemia indujo el proceso apoptótico en las células del tejido nervioso, se evaluó la condensación de la cromatina por coloración con Hoechst. Para esto inicialmente los cortes fueron permeabilizados con PBS-tritón al 1% por 10 min, luego se lavaron y se colocó 50 µl de Hoechst (0.005 mg/ml) o yoduro de propidio (0.005 mg/ml) por 10 min en oscuridad. Se lavaron los cortes y se colocaron en glicerol tamponado, se cubrieron con una laminilla para evitar la deshidratación. Las láminas se almacenaron a -20°C protegidas de la luz hasta el análisis en el microscopio de fluorescencia. Posteriormente, se repitió el procedimiento de permeabilización pero aumentando la concentración del Triton X1000 al 5% y el corte histológico permaneció con el detergente durante 90 minutos. Después se hizo los lavados y se continuó como se describió antes.

2.9 Obtención de proteínas de la médula espinal

Los animales anestesiados se sacrificaron y se realizó la disección de la médula espinal bajo magnificación con microscopio quirúrgico a 10x, y 16x (Vasconcello ®). El tejido se congeló en nitrógeno líquido. Una vez congelado, se cortó en trozos pequeños cuidando de mantenerlos congelados. Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido hasta ser procesados. Se sacaron los tubos del nitrógeno líquido uno por uno, mientras la muestra estaba aun congelada y se colocaron en presencia de una mezcla de detergentes, para cada médula espinal se colocó 1 ml de: Tritón 1%, DOC 0.5%, CHAPS 1%, Tween 0.2%, Nonident P-40 1%, PMSF 100 µg/ml y EDTA 1mM. Se dio vortex por 5 min y se incubó 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 20 min, se recuperó y se guardó el sobrenadante a 4°C (primera extracción). Al pellet, se le colocó nuevamente el buffer anterior y se repitió

todo el proceso cuatro veces con el fin de realizar cuatro extracciones para separar los lípidos de las proteínas del tejido. El pellet que quedó tras las cuatro extracciones se incubó con hidroclorehidrato de guanidina 6M toda la noche en agitación continua, con el fin de desnaturalizar y precipitar las proteínas que pudieron haber quedado en el pellet. Al otro día se agregó 3 volúmenes de acetona y se conservó a -70°C por una hora, al cabo de ese tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió, en diferentes buffer dependiendo si se iba a realizar ELISA o SDS-PAGE (ver más adelante).

Por medio de electroforesis se evaluó la obtención de bandas proteicas en cada una de estas fracciones.

2.10 ELISA

A partir del extracto proteico obtenido del tejido de médula espinal, se tomaron 50 μ l de este extracto y se colocaron en una placa para ELISA toda la noche a 4°C. Al otro día se retiraron las muestras y se lavaron tres veces con PBS por 5 min cada lavado. Luego la placa se bloqueó con leche en polvo descremada 5% durante una hora a 37°C, se retiró la leche y se lavó la placa tres veces con PBS durante 5 min cada lavado. Luego se colocó el anticuerpo primario: anti-PDI o anti-ERp57 (Santa cruz) en dilución 1:1000, la placa se incubó por 1 h a 37°C. Se lavó tres veces con PBS (5 min cada lavado) y se colocó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Santa Cruz) 1:5000 durante una hora a 37°C. La placa se reveló utilizando como sustrato OPD (O-Fenilenediamina dihidrocloruro) (Pierce) diluido en buffer peroxidasa durante 15 a 20 minutos. El revelado se detuvo con ácido sulfúrico 2,5 M y se leyó a 492 nm en un lector de ELISA. Como control negativo se utilizaron pozos tratados con los anticuerpos anteriormente descritos pero sin antígeno (extracto proteico). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS.

2.11 Electroforesis SDS-PAGE y Western blot

A partir de las proteínas obtenidas y purificadas de la médula espinal de las ratas se realizó electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Para esto se tomaron alícuotas de las proteínas extraídas y se adicionó un volumen de buffer Laemli SDS 1x (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol y 5% 2-β-mercaptoetanol correspondientes a 10x el peso húmedo de la muestra. Se dio vortex por 1 min a temperatura ambiente. Se aseguró que el tejido estuviera solubilizado. Luego las muestras se hirvieron por 5 min.

Una vez corrida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF durante toda la noche a temperatura ambiente en una cámara semihúmeda a 32 mA. Se retiró la membrana de la cámara. Se bloqueó con leche en polvo semi descremada al 5% durante 1h a 37°C y toda la noche a 4°C. Al otro día se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 min, con PBS y se incubó con anticuerpo primario monoclonal anti-PDI o anti-ERp57 (Santa cruz) en dilución 1:1000 por 1 h a 37°C. Luego se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 min, con PBS, después, se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Santa Cruz 1:1000) y se reveló usando como sustrato carbazole (ya descrito).

2.12 Cuantificación de la producción de malondialdehido

Teniendo el tejido medular congelado se adicionó 2.4 ml de H₂SO₄ 12N y 0.3 ml de ácido fosfotungstico al 10%, se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se dió vortex por 5 min y se centrifugó a 1600 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 4 ml de agua destilada. Luego se adicionó 1ml de ácido tiobarbitúrico (0.67%). Las muestras se calentaron en agua hirviendo por 1h. La solución formada se extrajo con n-butanol, se centrifugó a 1600 g por 10 min. Se separó la capa orgánica y se midió la absorbancia a 532 nm, se usó tetrametoxipropano como patrón y los niveles de malondialdehido se calcularon como µg/ml.

2.13 Análisis estadístico

Dado el pequeño tamaño de la muestra se prefirió hacer una descripción amplia de los resultados.

3. RESULTADOS

3.1 Determinación por inmunocitoquímica e inmunofluorescencia de las proteínas PDI y ERp57

Dado que la disminución de la perfusión produce hipoxia celular y esto altera el equilibrio de oxido-reducción, es probable que se modifique la expresión de las proteínas relacionadas con estos eventos. De estas proteínas la familia de proteínas PDIs está relacionada directamente con los mecanismos de oxido-reducción y a dicha familia pertenecen PDI y ERp57. Con el fin de determinar si en la médula espinal de rata se producía algún cambio en la expresión de las proteínas PDI y ERp57, se realizó inmunofluorescencia e inmunocitoquímica para estas proteínas. Para esto el corte histológico fue permeabilizado con Triton X100 al 1% durante diez minutos y posteriormente se incubaron con anticuerpos contra PDI o ERp57

Los resultados de las figuras 6 y 7 con inmunocitoquímica son negativos en cuanto no se detecta PDI ni ERp57. Este resultado fue inesperado, dado que PDI y ERP57 son proteínas constitutivas y deben estar en las células analizadas, sugiriendo que no hay una adecuada permeabilización y el anticuerpo no puede reconocer el antígeno. Otra posibilidad es que haya poca cantidad de PDI y ERP57 en las células de la médula espinal de la rata y el anticuerpo no lo detecte adecuadamente por la pobre permeabilización. (Ver las figuras en las páginas siguientes)

PDI

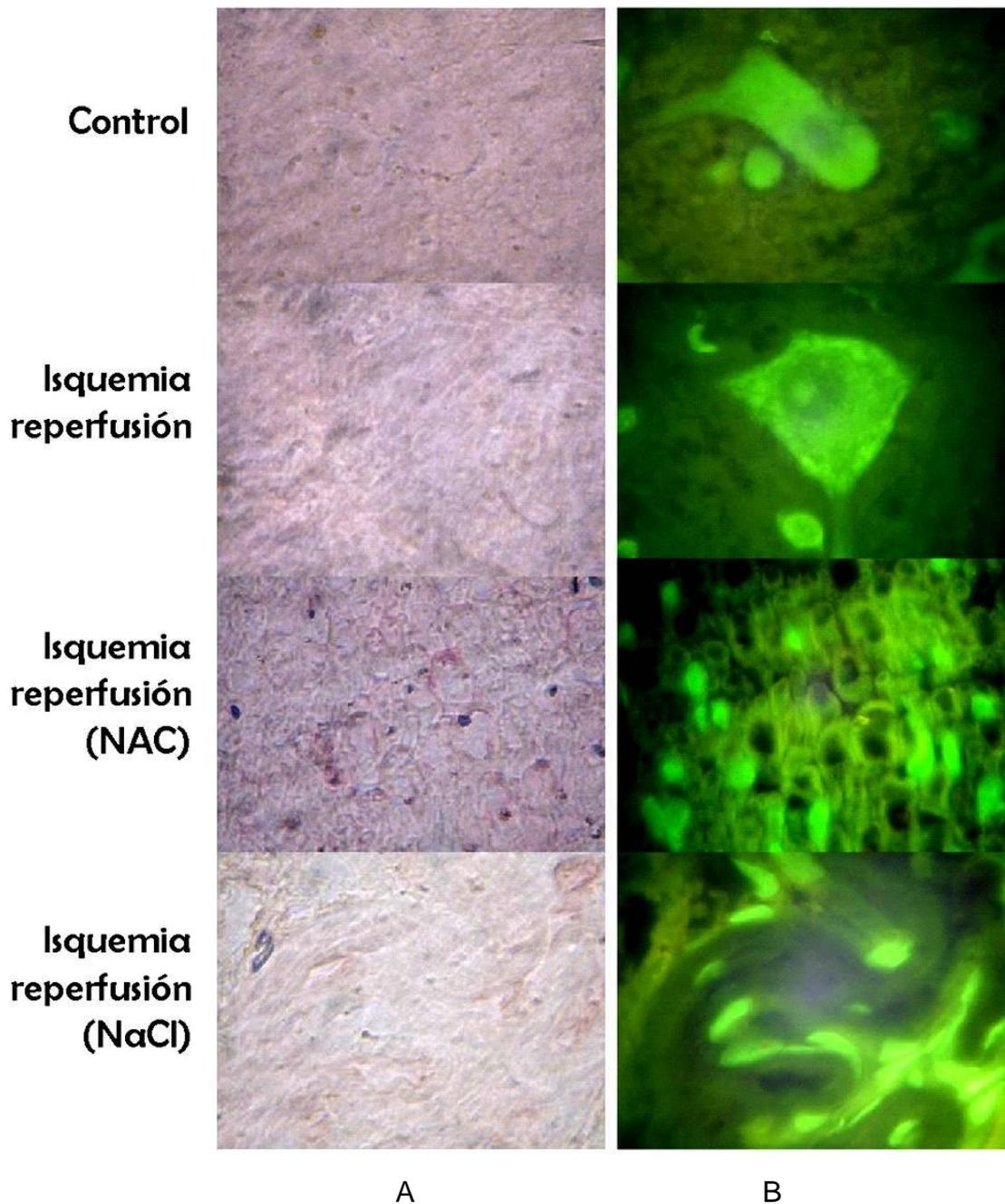


Figura 6. Inmunocitoquímica y tinción con Hoescht. **A.** El corte histológico se incubó con el anticuerpo anti-PDI (2 μ g/ml, Santa Cruz) para cada uno de los cuatro grupos experimentales y luego se adicionó un anticuerpo conjugado con peroxidasa y se reveló con Carbazole. **B.** El corte histológico se incubó con tinción de Hoescht (0.05 μ g/ml). G1: control, G2: isquemia/reperfusion, G3: isquemia/reperfusion con NAC y G4: isquemia/reperfusion con NaCl. Las placas se analizaron con un Aumento 100X, microscopio VanGuard.

ERp57

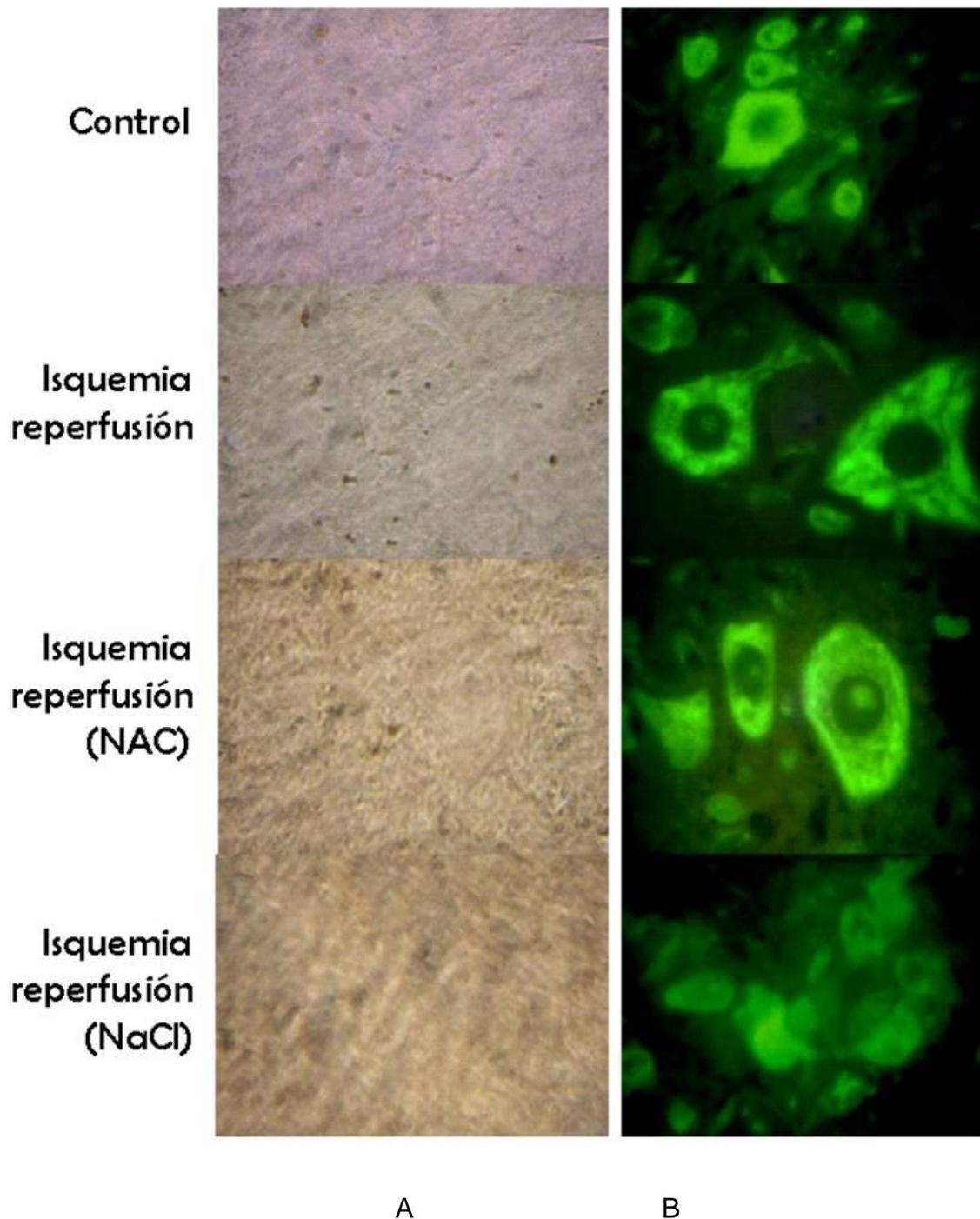


Figura 7. Inmunocitoquímica y tinción con Hoescht. **A.** El corte histológico se incubó con el anticuerpo anti-ERP57 (2 μ g/ml, Santa Cruz) para cada uno de los cuatro grupos experimentales y luego se adicionó un anticuerpo conjugado con peroxidasa y se reveló con Carbazole. **B.** El corte histológico se incubó con tinción de Hoescht (0.05 μ g/ml). G1: control, G2: isquemia/reperfusion, G3: isquemia/reperfusion con NAC y G4: isquemia/reperfusion con NaCl. Las placas se analizaron con un Aumento 100X, microscopio VanGuard.

Con el mismo propósito se determinó la expresión de PDI y ERP57 mediante la técnica de inmunofluorescencia, que es más sensible que la inmunohistoquímica. Para esto el corte histológico fue permeabilizado con Triton X-100 al 1% durante diez minutos y posteriormente se incubaron con anticuerpos contra PDI o ERP57. Como se muestra en la figura 8 (página siguiente), con esta metodología tampoco se pudo detectar PDI o ERp57. Este resultado apoya lo expuesto anteriormente: no hay una adecuada permeabilización y el anticuerpo no puede reconocer el antígeno. Esta afirmación se fundamenta en el hecho que son proteínas constitutivas y por lo menos algunas células, en cualquiera de los tratamientos, debería ser positiva para cualquiera de las dos proteínas. Sin embargo, no se descarta que normalmente haya baja concentración de estas proteínas en la médula espinal de la rata.

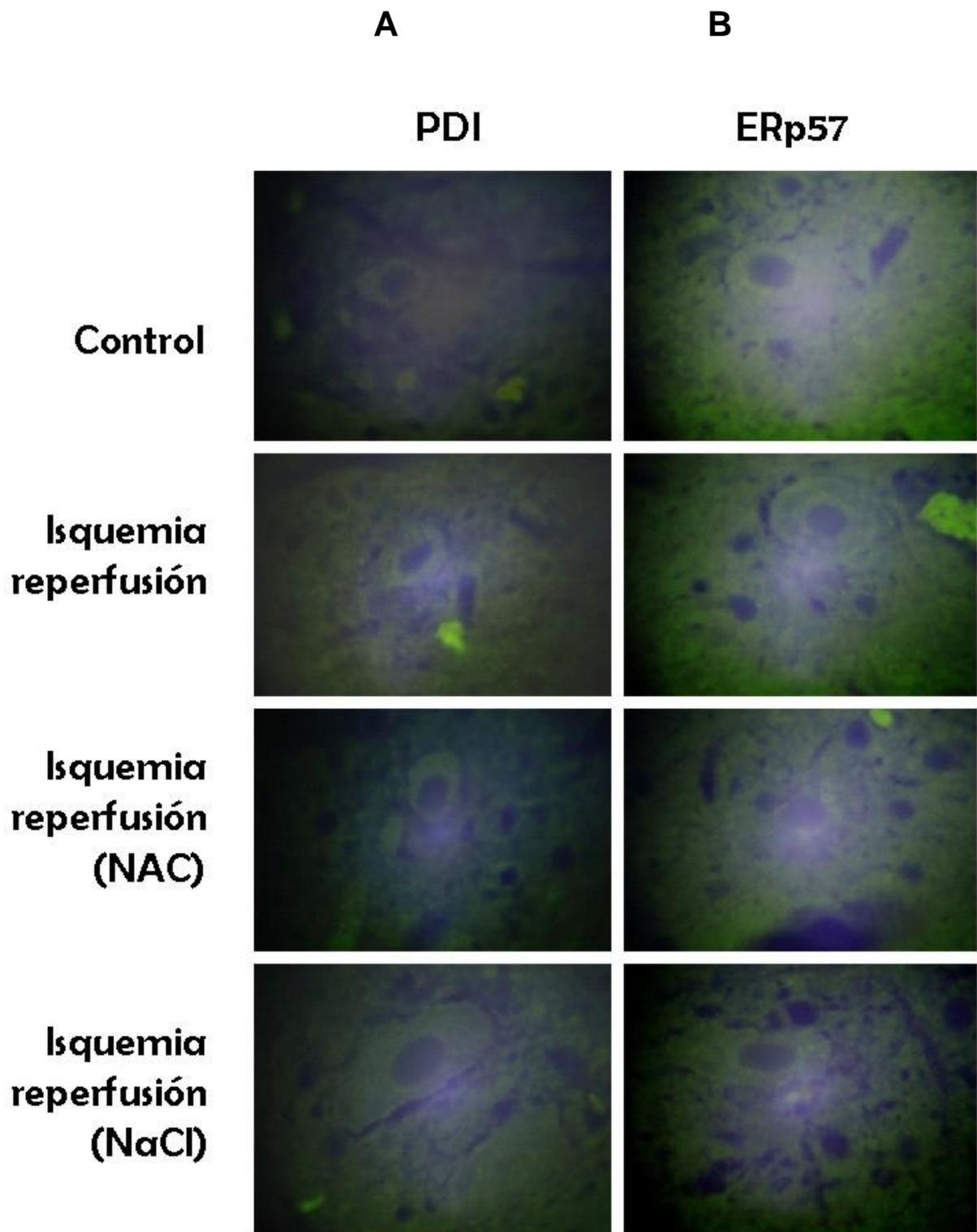


Figura 8. Inmunofluorescencia de los cortes histológicos de la médula espinal. Los cortes fueron permeabilizados con Triton X100 al 1% durante 10 minutos, lavados y luego se incubaron con anticuerpos anti-PDI o anti-ERP57 ((2 μ g/ml, Santa Cruz). **A.** Anti-PDI. **B.** Anti ERP57 Los cuatro grupos experimentales fueron: G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión con NaCl. Aumento 100X, microscopio VanGuard.

3.2 Determinación de la condensación de la cromatina en cortes de médula espinal.

Dado que la disminución de la perfusión genera hipoxia y esta puede inducir muerte celular por apoptosis, se quiso evaluar cualitativamente si existían signos de apoptosis en algunas células del tejido. Para evaluar la apoptosis se utilizó la tinción con Hoechst. En este caso el tejido se permeabilizó con Triton X100 al 1% durante diez minutos y se agregó Hoechst. Este reactivo penetra hasta el núcleo y se une al DNA; para evaluar la integridad del DNA se observa el tejido con luz UV, si el núcleo se observa homogéneo es indicativo de integridad del DNA, pero si se observa que el núcleo está fragmentado en pequeñas porciones, sugiere que el DNA se ha roto y se ha reagrupado en segmentos. La fragmentación del DNA es un indicador de apoptosis y de manera indirecta indicaría si hubo muerte celular por hipoxia.

En la figura 9 se muestran diferentes fotografías del grupo 2 (isquemia/reperfusión). De A-F se observan neuronas sin condensación de cromatina y en las fotografías C,E,G,H células pequeñas con condensación de cromatina. Aunque no se utilizó ningún marcador para identificar las células, por el tamaño y la morfología podría tratarse de neuronas. En general en esta figura no se aprecia claramente el núcleo de las células, excepto en las células pequeñas; la imagen no logra demostrar diferencias importantes y no hay buena intensidad de la fluorescencia. (Ver figura en la página siguiente)

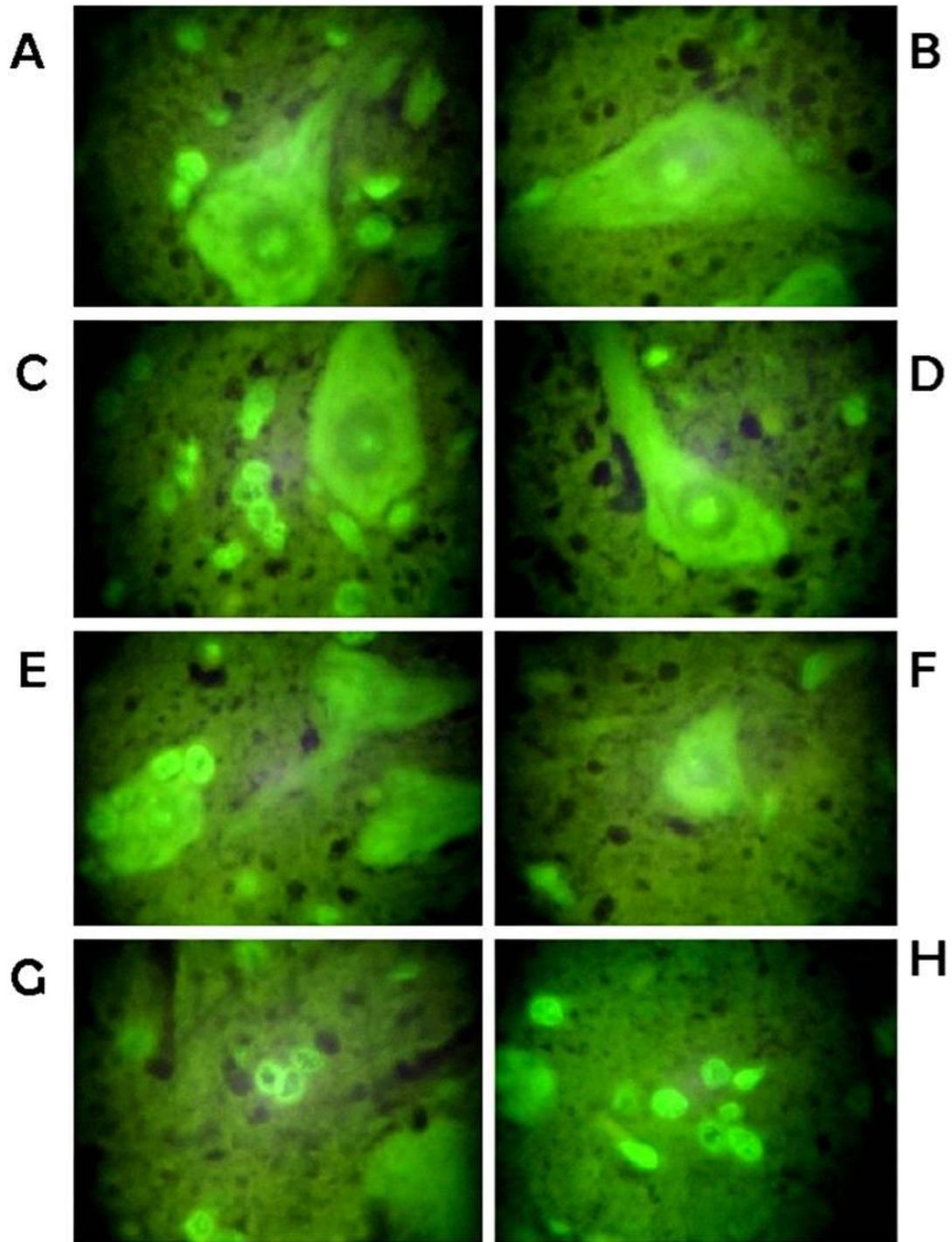


Figura 9. Tinción de Hoechst para cortes de médula provenientes de ratas del grupo experimental 2 (isquemia/reperfusión). Aumento 100x, microscopio VanGuard.

En la figura 10 (página siguiente) se muestran las fotografías de los cortes con tinción de Hoechst para los 4 grupos experimentales (G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión con NaCl). En este caso el número de células con condensación de la cromatina no es muy alta y dado que la intensidad de la fluorescencia es similar para todos, es difícil apreciar las diferencias entre los distintos tratamientos. En especial, se observa que las células grandes no muestran diferencias entre los tratamientos. En cambio, algunas células pequeñas pareciera tener algún grado de condensación de la cromatina, en especial en el grupo 2 y 4.

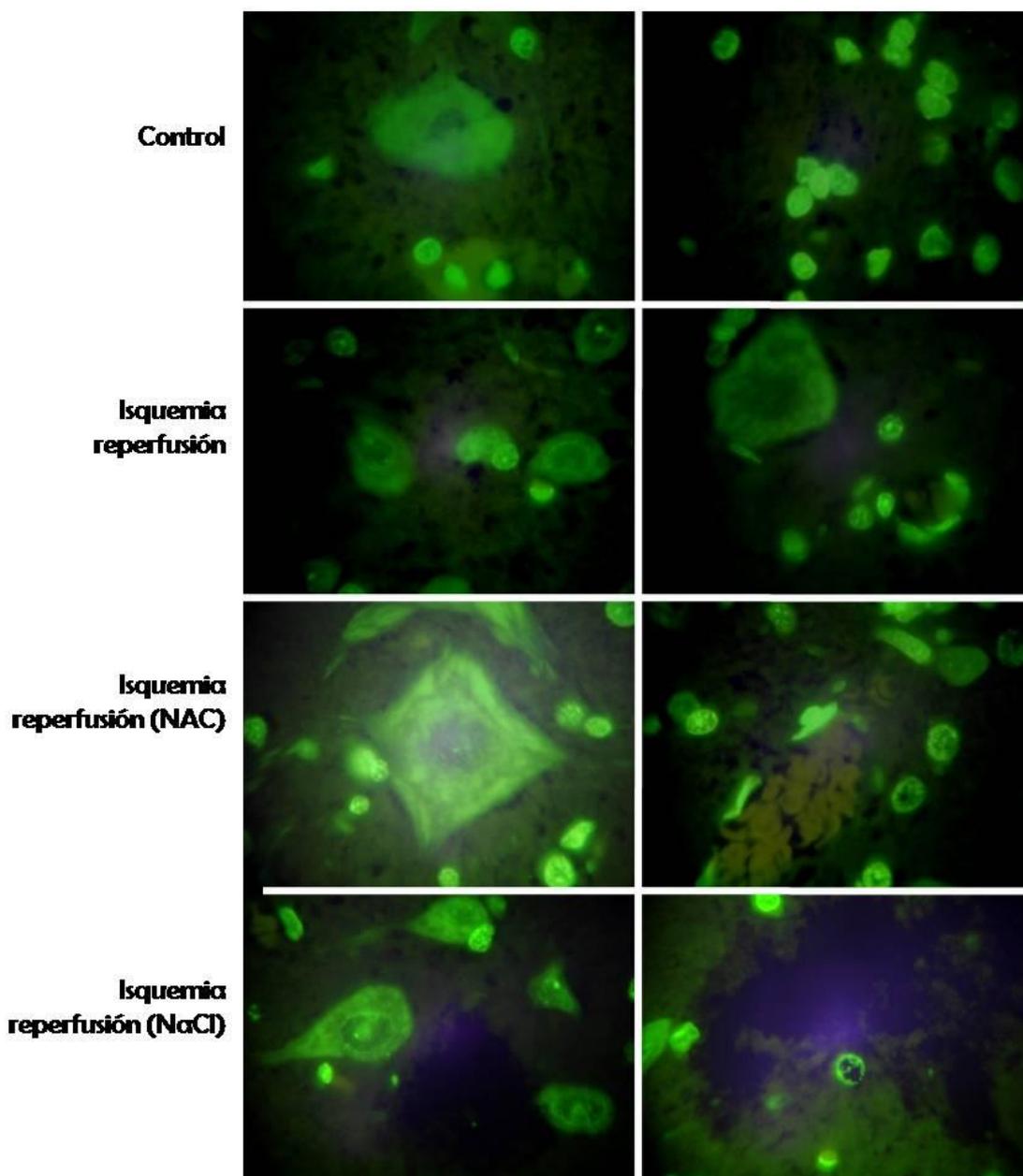


Figura 10. Determinación de la condensación de cromatina por tinción con Hoechst. Los cortes provenientes de médulas espinales de individuos de los cuatro grupos experimentales se tiñeron con Hoechst, para cada grupo se colocaron dos fotografías. Aumento 100x, microscopio Vanguard.

3.3 Determinación por western blot y ELISA de las proteínas PDI y ERp57

Con el fin de determinar cambios en la expresión de las proteínas PDI y ERP57, se realizó electroforesis SDS-PAGE y western blot. El peso molecular de la PDI es cercano a los 56kd, similar al de la Erp57 (56.6 kd) En la figura 11 se muestra una electroforesis SDS-PAGE donde se colocaron muestras de proteínas con suficiente concentración de proteínas (0.05 mg/ml) para asegurar una buena transferencia a la membrana PVDF en la realización del western blot.

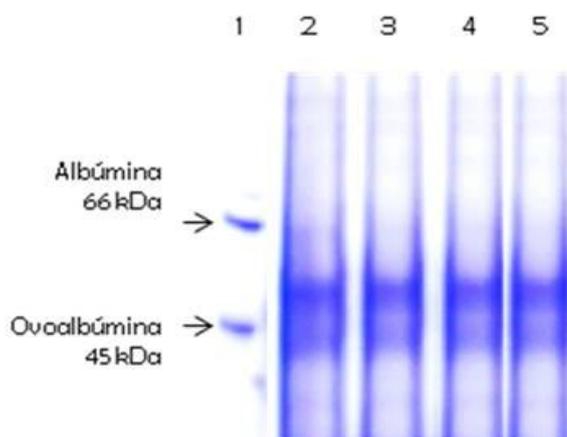


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE. Con las proteínas obtenidas y purificadas a partir del tejido medular de las ratas se realizó la electroforesis con igual concentración de proteína (0.05 mg/ml). Carril 1: marcador de peso molecular albúmina y ovoalbúmina. Carriles 2-5: proteínas extraídas de los cuatro grupos experimentales G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión. El gel fue teñido con azul de coomassie.

Al hacer el Western blot e incubar con anticuerpos contra PDI y ERP5, estos no detectaron las proteínas. Esto sugiere que la concentración de las proteínas en el tejido es bajo, a pesar que se utilizó una alta concentración del anticuerpo. Dado que el resultado en el Western blot fue negativo se procedió a determinar

la presencia de estas proteínas por medio de la técnica de ELISA ya que es más sensible que el Western blot. En la figura 12 se muestran los resultados de la cuantificación de PDI y ERp57 por ELISA. En esta gráfica se observa, que respecto al control negativo no hay una expresión abundante de las proteínas PDI ni ERp57 en ninguno de los cuatro tratamientos, así como tampoco hubo diferencias significativas entre las muestras de los cuatro tratamientos. Sin embargo hay una tendencia hacia un aumento en la expresión de la proteína PDI en el grupo 2 (isquemia/reperfusión) y 4 (isquemia/reperfusión NaCl). Este resultado indica que la proteína PDI si está en las células de la médula espinal de la rata, pero probablemente la concentración es muy baja y no se puede detectar por técnicas como el Western blot.

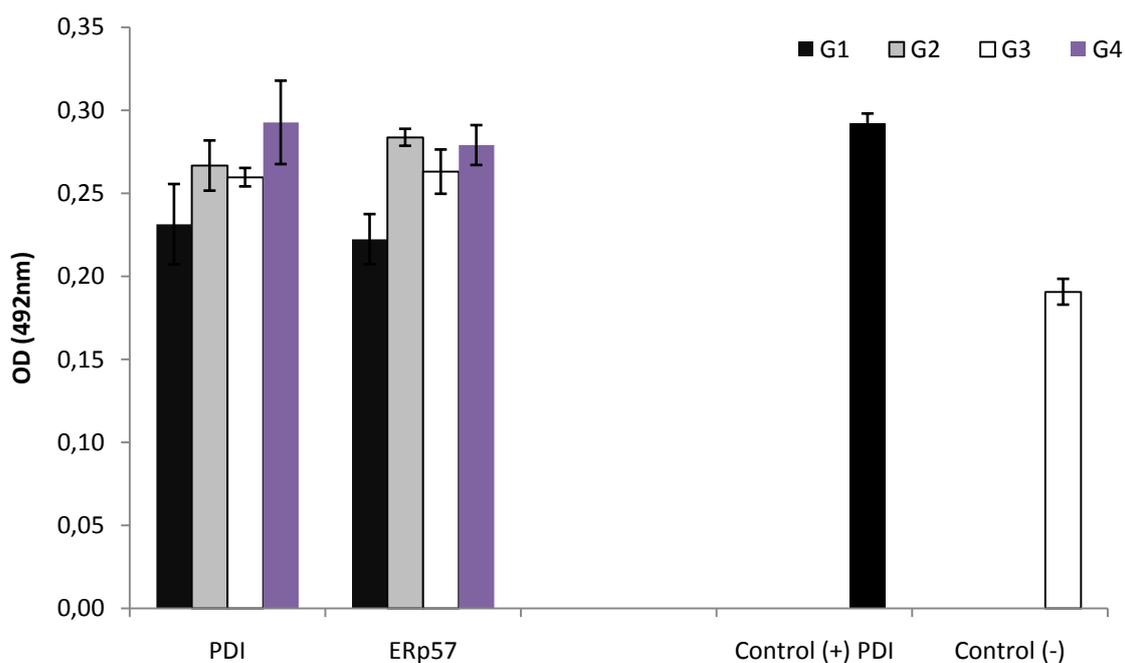


Figura 12. ELISA para detectar PDI y ERP57. Se realizó ELISA directa según materiales y métodos. Los grupos de tratamiento corresponden a G1: control, G2: isquemia/reperfusión, G3: isquemia/reperfusión con NAC y G4: isquemia/reperfusión con NaCl, respectivamente. El error estandar corresponde al promedio de dos experimentos. Como controles positivo y negativo de la técnica se utilizaron proteína PDI recombinante y pozos con los anticuerpos pero sin antígeno. La absorbancia del control negativo se restó a todos los tratamientos.

3.4 Análisis de la condensación de la cromatina e inmunofluorescencia de las proteínas PDI y ERp57 en cortes de médula espinal permeabilizados con Tritón X.100 al 5% durante 90 minutos.

Para determinar si los resultados descritos anteriormente obedecen a la poca permeabilización de los cortes histológicos, se decidió aumentar del 1% al 5% y mantener el detergente sobre el corte histológico durante 90 minutos. Con esto se buscaba aumentar la extracción de lípidos del tejido y mejorar la penetración de los anticuerpos y del reactivo Hoechst o de la luz UV. Al tratar el corte histológico con Hoechst mejoró la intensidad de la fluorescencia y se puede apreciar diferencias en el grado de condensación de la cromatina. Se apreció que el grupo 2 y 4 presentaron un mayor grado de fragmentación, respecto al grupo 1 y 3. Esto sugiere que al tratar las ratas con NAC se mejora la capacidad reductora de la célula y esto de manera indirecta disminuye la muerte celular por apoptosis.

Al hacer la inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos contra PDI y ERP57, se observó que la intensidad de la fluorescencia es muy baja, aunque ligeramente mas alta respecto a la figura 8. En este caso la fluorescencia más baja se detectó en el grupo 1. Esto sugiere que es poca la cantidad de PDI y ERP57 que expresan normalmente las células de la médula espinal de rata. Las del grupo 2 poseen una fluorescencia leve a moderada sugiriendo que la PDI y ERP57 aumentan la expresión en condiciones de hipoxia. En el grupo 3 la intensidad de la fluorescencia es menor que las del grupo 2, sugiriendo que la NAC al mejorar las condiciones de reducción celular, de manera indirecta se reduce la expresión de las proteínas chaperonas PDI y ERP57. Estos resultados apoyan lo sugerido respecto a los obtenidos en el Western Blot, aunque no de manera concluyente. No se descarta que aún persista el problema de penetración del anticuerpo, dado que las proteínas se encuentran mayoritariamente en retículo endoplásmico.

3.5 Evaluación histológica de los cortes de médula espinal

En el análisis histológico se utilizó tinción con hematoxilina-eosina, para muestras de cada uno de los cuatro grupos de experimentación. Se buscó diferencias en el número de neuronas en cada uno de los cortes, y hacer una clasificación subjetiva del grado de desorganización tisular. Los resultados no mostraron diferencias apreciables por este método entre los diferentes grupos. Es posible que la duración de la isquemia no haya sido lo suficientemente prolongada como para que aparecieran alteraciones histológicas detectables con estas tinciones. A favor de esta explicación está el hecho de que dentro de las primeras 8 horas postoperatorias, se hacía manifiesto un déficit neurológico dado por debilidad de los cuartos traseros en los grupos 1, 2, y 3. Este déficit, sin embargo, había desaparecido por completo a las 24 horas postoperatorias (momento del sacrificio).

3.6 Cuantificación de la producción de malondialdehido

Se conoce que la isquemia conlleva a un grado de estrés celular el cual puede provocar aumento de las especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno. Los radicales libres tienen gran capacidad oxidativa y producen peroxidación lipídica de los ácidos grasos de las membranas celulares. Por tal motivo se pretendió evaluar la producción de malondialdehido como un indicador del daño oxidativo en la célula causado por la isquemia/reperfusión.

En la figura 13 (página siguiente) se muestra la determinación de malondialdehido. Se encontró un valor elevado de la concentración de malondialdehido para los individuos del grupo 2 (isquemia/reperfusión), adicionalmente se observa que el tratamiento con NAC disminuyó la producción de malondialdehido, mientras que el tratamiento con NaCl no tuvo este efecto.

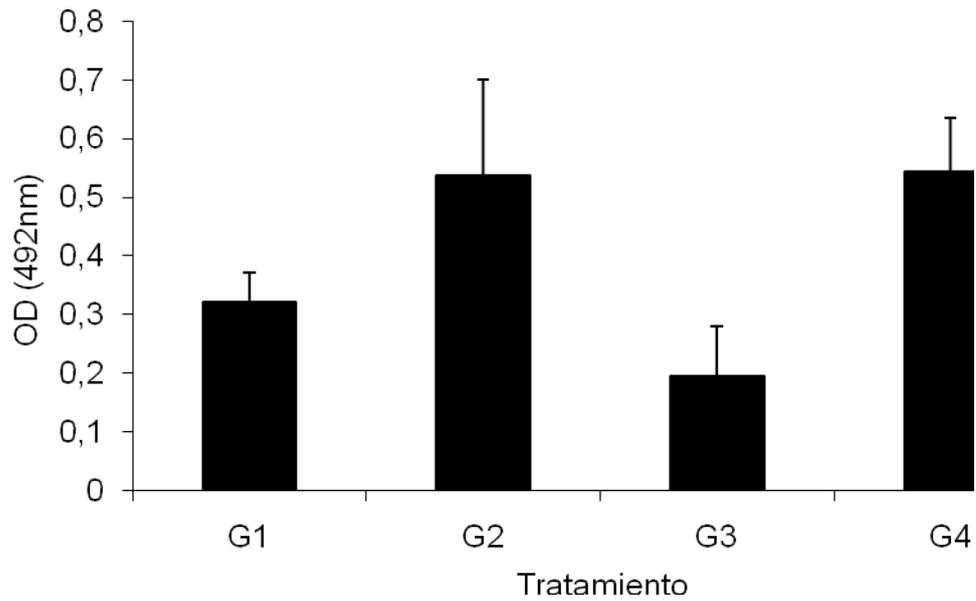


Figura 13. Determinación de malondialdehído. A partir de la médula espinal de los animales se obtuvo el malondialdehído y se determinó su absorbancia por espectrofotometría según materiales y métodos. Los grupos de tratamiento corresponden a grupo sin isquemia ni reperfusión, G1: control. G2: isquemia/reperfusión. G3: isquemia/reperfusión tratados con NAC y G4: isquemia/reperfusión tratados con NaCl. Se muestra el promedio \pm desv prom.

3.7 ANALISIS DESCRIPTIVO.

La cuantificación de las proteínas chaperonas PDI y Erp57 mostró valores bajos en todos los grupos. Pese a que los resultados de los grupos 2 y 4 son numéricamente mayores que los de los otros dos grupos (control y NAC), y estarían de acuerdo con la hipótesis de trabajo, no es posible asumir que esta diferencia sea real.

La evaluación cualitativa de marcadores intracelulares de apoptosis mostró la aparición de células con aparente fragmentación de DNA en especial en los grupos 2 y 4. Sin embargo, no se puede establecer una diferencia real entre los grupos.

La medición del malonil dialdehído (MDA) mostró valores más elevados que el grupo control en el grupo 2 (isquemia reperusión) y en el grupo 4 (Solución salina). En el grupo de la NAC mostró valores más bajos que en el grupo control.

4. DISCUSIÓN

La falta de adecuado aporte de oxígeno al tejido nervioso es un factor determinante de su funcionamiento y de su supervivencia. Cuando se prolonga por un tiempo que sobrepasa la mínima tolerancia del tejido nervioso, se desencadena una serie de eventos que se suman en sus efectos deletéreos sobre las neuronas. Estos eventos per se producen gran daño tisular, por lo que la rápida restauración del aporte de oxígeno a través de la restitución del flujo sanguíneo se convierte en el objetivo primario del tratamiento. Sin embargo, los cambios bioquímicos intracelulares de la isquemia predisponen a un daño aún más severo con la reperfusión. Este se manifiesta por la generación de radicales libres que empeoran la gravedad de la lesión a las proteínas de la célula, y peor todavía, a los lípidos de las membranas.

En el modelo propuesto de isquemia/reperfusión del tejido nervioso afectado fue la médula espinal, en lo que corresponde a los niveles irrigados por la arteria aorta abdominal infrarenal. Siguiendo modelos conocidos de isquemia medular experimental (2, 4), se realizó la oclusión extrínseca transitoria de la aorta durante 45 minutos. Este tiempo genera un déficit neurológico que fue clínicamente reversible, al menos para el modelo utilizado. Es posible que un tiempo de isquemia más prolongado produzca una lesión permanente o predisponga a un daño más severo por reperfusión. Otros modelos han incluido la hipotensión sistémica por hipovolemia como factor potenciador de la lesión medular, pero para el caso del modelo previsto no se consideró tal posibilidad. Otros factores que pudieron influir en los resultados son la menor especialización del tejido nervioso de la rata respecto al mismo tejido en el ser humano (45), y la gran capacidad adaptativa de la rata al estrés.

Para la aplicación del medicamento en estudio, la N-acetil cisteína se utilizó el concepto de la vía intra arterial directa. Este modelo ofrecía la desventaja de la dificultad técnica, pero se logró la estandarización del procedimiento lo que permitió consolidar un tiempo quirúrgico promedio desde la incisión de la piel hasta la colocación del clip en la aorta de 7 minutos, una vez dominada la técnica. La gran ventaja de la colocación intra arterial directa del medicamento

es el aumento controlado de la biodisponibilidad de la sustancia en el tejido específicamente afectado. Al ocluir totalmente el aporte sanguíneo a los segmentos medulares inferiores, se disminuye al mínimo la posibilidad de contaminación con sangre proveniente de otras arterias (46), y por ende de una fuente alterna y no controlada de radicales libres. Adicionalmente, el protocolo quirúrgico y de reperfusión permite controlar el factor físico de “lavado” del lecho vascular por la inyección de la NAC, al tener un grupo alterno con inyección de solución salina. La inyección pre-reperfusión del medicamento ayuda a evaluar la hipótesis de la suplencia de precursores de glutatión y glutatión peroxidasa con NAC, antes de que se desencadene el estrés oxidativo con la reperfusión.

La dosis que se utilizó de NAC fue de 150 mg/kg. Esta cantidad de medicamento es la dosis de carga que se utiliza en la práctica clínica para promover el control de la intoxicación por acetaminofén y de la intoxicación por cianuro. Sin embargo, la recomendación clínica es continuar con una infusión continua del medicamento por al menos 24 horas adicionales (47). Dada la tendencia en los resultados a favorecer el grupo en el que se usó la NAC, es posible que la dosis de carga sea parcialmente efectiva en proveer los precursores necesarios para los antioxidantes.

La dificultad en la detección de las PDIs (PDI y ERp57) puede deberse a varias razones. Una de ellas es la gran dificultad del paso de los anticuerpos al interior de la neurona por la alta concentración de lípidos en la membrana celular. Por esta razón se potenció el uso de los reactivos detergentes en el experimento, y así se obtuvieron resultados que demuestran una tendencia a la disminución de la expresión de estas proteínas chaperonas en el grupo 3 (NAC) con valores similares a los observados en el grupo control. Se destaca el mayor valor en los otros dos grupos. Sin embargo, hay que considerar también la opción de que las proteínas PDIs pueden ser ellas mismas afectadas por el estrés oxidativo. Esto disminuiría su expresión y su capacidad de respuesta ante la presencia de otras proteínas, como ha sido demostrado por algunos estudios (48). Se ha encontrado que durante el estrés oxidativo, las proteínas de la familia de las PDI se afectan por radicales libres de nitrógeno como el óxido nítrico y el

peroxinitrito, más que por radicales libres de oxígeno (48); este hallazgo podría explicar el bajo nivel global de PDIs.

El malonil dialdehído (MDA) es un producto de la degradación enzimática del ácido araquidónico, y se usa en modelos experimentales de evaluación de la peroxidación lipídica (49). Su medición en los diferentes grupos mostró valores favorables al uso de la NAC en la reperfusión post isquémica. Es posible que la cuantificación de otras sustancias como la deshidrogenasa láctica (LDH por sus iniciales en inglés) pudiera reforzar los resultados de este estudio. La LDH se libera del citoplasma de las células lesionadas una vez se pierden por completo las condiciones de permeabilidad de la membrana.

En general, los resultados globales muestran una tendencia a favorecer el efecto de la NAC como precursor de antioxidantes en el marco del fenómeno de la reperfusión post isquémica. Sin embargo, no es posible afirmar que las diferencias encontradas entre los grupos sean reales.

Antes de hacer cualquier recomendación se deben hacer estudios adicionales con muestras más grandes, y diferente análisis estadístico. Se pueden plantear investigaciones adicionales como el uso del antioxidante NAC para prolongar la ventana terapéutica en trombolisis del sistema nervioso, en estudios de peroxidación lipídica secundaria al trauma, en trabajos de evaluación de la transformación hemorrágica de amplias zonas del tejido nervioso luego de craniectomía descompresiva por infartos cerebrales o trauma, en la preparación de pacientes sometidos a cirugía de aneurismas toracoabdominales, etc.

El beneficio clínico de este tipo de estudios podría tener su expresión en la mejoría de la calidad de vida de las personas que están en riesgo de empeorar durante la reperfusión post isquémica. El impacto social, psicológico, y económico de minimizar un déficit neurológico devastador justifica el planteamiento y la realización de estudios adicionales en este campo.

CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica microquirúrgica de la isquemia transitoria de la médula espinal en ratas mediante la oclusión de la arteria aorta abdominal infrarenal. Así mismo, se estandarizó la técnica microquirúrgica de la reperfusión post isquémica medicada y no medicada de la médula espinal en ratas, luego de la oclusión de la arteria aorta abdominal infrarenal

Con los resultados de este trabajo no es posible afirmar con certeza que la NAC disminuya los efectos secundarios lesivos de los radicales libres de oxígeno en la reperfusión post isquémica del tejido nervioso. Sin embargo, tampoco se puede afirmar lo contrario, y en todos los análisis hubo resultados que favorecen, aunque no en forma conclusiva, la hipótesis del efecto protector de la NAC en la reperfusión post isquémica del tejido nervioso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009. 111: 483-95.
2. Kanellopoulos, G. K. Kato, H. Hsu, Ch. Y. Kouchoukos, N.T. Spinal Cord Ischemic Injury. Development of a New Model in the Rat. *Stroke.* 1997. 28: 2532-2538.
3. Masson C., Leys, D. Meder, J.F. Dousset, V. Pruvo J.P Ischémie médullaire. *J Neuroradiol.* 2004. 31: 35-46.
4. Kurita, N., Kawaguchi, M., Horiuchi, T., Inoue, S., Sakamoto, T., Nakamura, M., Konishi, N., Furuya, H. An Evaluation of White Matter Injury After Spinal Cord Ischemia in Rats: A Comparison with Gray Matter Injury. *Anesth Analg.* 2005. 100: 847-854.
5. MedicineNet.com. <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=11575>
6. Schewe T. 15-Lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol Chem.* 2002. 383: 365-374.
7. Phillis J., Smith-Barbour M., Perkins L., O'Regan M. Characterisation of glutamate, aspartate, and GABA release from ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res Bull.* 1994. 34: 457-466.
8. Hu M., Zhang X., Liu W., Cui H., Di N. Longitudinal changes of defensive and offensive factors in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Brain Res Bull.* 2009. 79: 371-375
9. Gill R., Soriano M., Blomgren K., Hagberg H., Wybrecht R., Miss M., Hofer S., Adam G., Niederhauser O., Kemp J., Loetscher H. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002. 22: 420-430.

10. Spranger M., Krempien S., Schwab S., Donneberg S., Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. *Stroke*. 1997. 28: 2425-2428.
11. Pearson M., Lipowsky H. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000. 279: H1460-H1471.
12. Aronowski J., Strong R., Grotta J. Reperfusion Injury: Demonstration of Brain Damage Produced by Reperfusion After Transient Focal Ischemia in Rats. *J of Cereb Blood Flow Metab*. 1997. 17: 1048-1056.
13. Halestrap A. Elevation of pH with reperfusion can open the MPTP. *Biochem Soc Trans*. 2006. 34: 232-237.
14. Faraci F. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol*. 2006. 100: 739-743.
15. Rosell A., Alvarez J., Arenillas J. A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong Relation Between MMP-9 and MMP-13 With Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke. *Stroke*. 2005. 36: 1415-1420.
16. Gidday J., Gasche Y., Copin JC. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. 289: H558-H568.
17. Rosenberg G., Estrada E., Dencoff J. Matrix Metalloproteinases and TIMPs Are Associated With Blood-Brain Barrier Opening After Reperfusion in Rat Brain. *Stroke*. 1998. 29: 2189-2195.
18. Weed R., LaCelle P., Merrill E. Metabolic dependence of red cell deformability. 1969. *J Clin Invest*. 48: 795-809.

19. Titova E., Ostrowski R., Rowe J., Chen W., Zhang J., Tang J. Effects of superoxide dismutase and catalase derivatives on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2008. 105 :33-35.
20. Chan P. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996. 27: 1124-1129.
21. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1973. 134: 707-716.
22. Aitio, M.L. N-acetylcysteine: passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol.* 2006. 61: 5-15.
23. Zafarullah M, Li W, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003. 60: 6–20.
24. De Rosa S., Zaretsky M., Dubs J., Roederer M., Anderson M., Green A., Mitra D., Watanabe N., Nakamura H., Tjioe L., Deresinski S., Moore W., Ela S., Parks D., Herzenberg L. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest.* 2000. 30: 915-929.
25. Galli F., Ghibelli L., Buoncristiani U., Bordoni V., D'Intini V., Benedetti S., Canestrari F., Ronco C., Floridi A. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant.* 2003. 18: 1592-1600.
26. Himmelfarb J., Hakim R. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003. 12: 593-598.
27. Molnar Z., Szakmany T., Koszegi T. Prophylactic N-acetylcysteine decreases serum CRP but not PCT levels and microalbuminuria following major abdominal surgery. A prospective, randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Intensive Care Med.* 2003. 29: 749-755.

28. Taniyama Y., Griending K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003. 42 :1075-1081.
29. Matsumiya N., Koehler R., Kirsch J., Traystman R. Conjugated superoxide dismutase reduces extent of caudate injury after transient focal ischemia in cats. *Stroke*. 1991. 22: 1193-1200.
30. Murillo M., Guerrero C. Mecanismos moleculares en la formación y degradación de los agentes oxidantes en la célula. *Rev Colomb Cienc Farmac*. 2003. 32: 72-80.
31. Mukherjee P., Marcheselli V., Serhan Ch., Bazan N. Neuroprotectin D1: A docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101: 8491-8496.
- 31a. Kakkar R., Bains J., Sharma S. Effect of Vitamin E on Life Span, Malondialdehyde Content and Antioxidant Enzymes in Aging *Zaprionus paravittiger*. *Gerontology*. 1996. 42: 312-321.
32. Sakamaki F., Hoffmann H., Müller C., Dienemann H., Messmer K., Schildberg F. Reduced Lipid Peroxidation and Ischemia-Reperfusion Injury after Lung Transplantation Using Low-Potassium Dextran Solution for Lung Preservation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1997. 156: 1073-1081.
33. Ostrea Jr. E., Red Cell Membrane Lipid Peroxidation and Hemolysis Secondary to Phototherapy. *Acta Pædiat*. 2008. 74: 378-381.
34. Halliwell B., Gutteridge J. Antioxidant Defences. En "Free Radicals in Biology and Medicine". 1999. (Third Edition). Pag 129-245.
35. Knuckey N., Palm D., Primiano M., Epstein M., Johanson C. N-acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 1995. 26: 305-311.

36. Dawson D., Masayasu H., Graham D., Macrae I. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosc Letters*. 1995. 185: 65-69.
37. Matsui T., Johsita H., Asano T., Tanaka J. Effect of a free radical scavenger, ebselen, on cerebral ischemia. En: "Pharmacology of Cerebral Ischemia". 1990. Pag 363-367.
38. Turano C., Coppari S., Altieri F., Ferraro A. Proteins of the PDI Family: Unpredicted Non-ER Locations and Functions. *J Cell Physiol*. 2002. 193:154-163.
39. Schwaller M., Wilkinson B., Gilbert H. Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem*. 2003. 278: 7154-7159.
40. Klappa P., Freedman R., Langenbuch M., Lan M., Robinson G., Ruddock LI. The pancreas-specific protein disulphide-isomerase PDIp interacts with a hydroxyaryl group in ligands. *Biochem J*. 2001. 354: 553-559.
41. Tanaka S., Uehara T., Nombra Y. Up-regulation of Protein-disulfide Isomerase in Response to Hypoxia/Brain Ischemia and Its Protective Effect against Apoptotic Cell Death. *J Biol Chem*. 2000. 275: 10388-10393.
42. Graven K., Molvar C., Roncarati J., Klahn B., Lowrey S., Farber H. Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002. 282: L996-L1003
43. Johnson E., Henzel W., Deisseroth A. An isoform of protein disulfide isomerase isolated from chronic myelogenous leukemia cells alters complex formation between nuclear proteins and regulatory regions of interferon-inducible genes. *J Biol Chem*. 1992. 267: 14412-14417.

44. Endres M., Dirnalg U., Moskowitz M. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. En "Handbook of Clinical Neurology". 2009. Vol. 92 (3rd series). Stroke, Part I. Pag 29-41.
45. Tracey D. Ascending and Descending Pathways in the Spinal Cord. En "The Rat Nervous System". 2004. (Third Edition). Pag 149-164.
46. Wingerd B. The Circulatory System. En "Rat Dissection Manual". 1988. Pag 52-62.
47. Heard K. Acetyl Cysteine for Acetaminophen Poisoning. N Engl J Med. 2008. 359: 285-92.
48. Mattson M. Nitro-PDI incites toxic waste accumulation. Nature Neurosc. 2006. 9: 865-867.
49. Erturka E., Cekica B., Gezea S. Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia–reperfusion injury. Eur Journal of Anaesth. 2009. 26: 279-284.