

El Estrés Oxidativo en un Modelo de Isquemia y Reperfusion en Hígado de Ratas Tratadas con Aprotinina.

Dra. Alexandra Bermúdez¹, Dra. Ela Céspedes^{1,2}, Dr. Antolín Romero³, Lic. Marisol Peña^{1,4}, Dr. José C. García¹.

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, ISCMH, ²Facultad de Medicina Calixto Garcia, ISCMH, ³Cardiocentro William Soler, ISCMH, ⁴Instituto de Neurología y Neurocirugía, ISCMH, Cuba.

ABSTRACT

Whenever organs undergo interruption of blood flow, tissues are temporarily deprived of oxygen and nutrients; unquestionably, restoration of blood flow increases tissue injury due to the production of reactive oxygen derived radicals. It has been described that pre-treatment with some antioxidants improve tissue viability after an occurrence of ischemia / reperfusion. Aprotinin is used in cardiovascular surgery with cardiopulmonary bypass due to its effect in the coagulation cascade and it has been attributed antioxidant properties to the drug. In this work the authors have developed a model of *in vivo* ischemia and partial reperfusion of rat liver with the employment of aprotinin before the ischemic event and the behavior of oxidative stress markers was evaluated. It was observed a reduction of the thiobarbituric acid-reactive products, reduction of the phospholipase A₂ and catalase enzymatic activity and an increase in the activity of superoxide dismutase in the group treated with aprotinin. In the nontreated group the mortality reached 58%. It was demonstrated a beneficial effect of aprotinin in this model.

Keywords: oxidative stress, ischemia-reperfusion, lipidic peroxidation, antioxidant enzymes, aprotinin.

RESUMEN

Cuando los órganos sufren interrupción del flujo sanguíneo, el tejido se priva temporalmente de nutrientes y oxígeno; sin embargo, la restauración del flujo sanguíneo incrementa el daño al tejido, debido a la generación de especies reactivas del oxígeno. Se ha descrito que el pretratamiento con algunos antioxidantes mejoran la viabilidad del tejido sometido a un evento de isquemia reperfusion. La aprotinina es utilizada en cirugía cardiovascular con circulación extracorpórea debido a su efecto antiproteásico en la cascada de la coagulación y se le atribuyen propiedades antioxidantes. En este trabajo se desarrolló un modelo *in vivo* de isquemia y reperfusion parcial de hígado de rata en el que se emplea la aprotinina previo al evento isquémico y se evaluó el comportamiento de marcadores de estrés oxidativo. Se observó una disminución de los productos reactivos al ácido tiobarbitúrico, de la actividad de las enzimas fosfolipasa A₂ y catalasa y un incremento en la actividad superóxido dismutasa en el grupo tratado con aprotinina. En el grupo no tratado con aprotinina se produjo una mortalidad de un 58%. Se demuestra un efecto beneficioso de la aprotinina en este modelo.

Palabras clave: estrés oxidativo, isquemia-reperfusion, peroxidación lipídica, enzimas antioxidantes, aprotinina.

Rev Latinoamer Technol Extracorp XIV,4,2007

INTRODUCCION

Una de las principales dificultades en el estudio y tratamiento de los procesos isquémicos radica en la caracterización adecuada de las fuentes del daño por isquemia-reperfusion a nivel celular en cada órgano y tejido, de forma tal que permitan establecer los agentes terapéuticos efectivos que corrijan o disminuyan la magnitud del daño e incluso, que permitan una mejor recuperación del paciente.

Se conoce que el período de tiempo que un tejido puede sobrevivir bajo privación de oxígeno es muy variable, pero eventualmente todos los tejidos isquémicos devienen necróticos. La restauración del flujo sanguíneo puede minimizar el daño, pero la extensión de este daño se incrementa precisamente cuando se restaura el flujo sanguíneo, debido a la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Existen numerosas evidencias que demuestran la participación de las ERO en este daño en

miocardio y pulmones. La cadena de transporte de electrones, el citocromo P₄₅₀ microsomal y sus enzimas donadoras de protones, la NADPH oxidasa, la mieloperoxidasa y la xantina oxidasa, entre otras, son fuentes de ERO durante los eventos de I/R (1-4).

Se ha descrito que el pretratamiento con inhibidores de la xantina oxidasa o con algunos antioxidantes mejoran la viabilidad del tejido luego del daño por isquemia reperfusion (I/R). La aprotinina, inhibidor de proteasas, se ha utilizado en la profilaxis y tratamiento de trastornos hemostáticos asociado a la cirugía cardiovascular y se ha observado modificación en indicadores de estrés oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular con circulación extracorpórea en los que se utilizó este inhibidor de proteasas (5-8).

Dada su acción antiproteásica, reduce la fibrinólisis (9-11), y se le atribuyen propiedades antiinflamatorias (12,13).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió evaluar el papel de la aprotinina, administrada como pretratamiento al animal y como suplemento en la reperfusión, sobre indicadores de estrés oxidativo en hígado de rata sometido a un evento agudo de I/R *in vivo*.

MATERIAL Y METODOS

Modelo Isquemia/Reperfusión “in vivo”.

Se utilizaron 22 ratas Wistar, machos, 10-15 semanas, procedentes del Centro de Animales de Laboratorio (CENPALAB), peso promedio entre 250-350 g. Los animales se trasladaron en jaulas metabólicas a razón de cinco, 72 horas antes de los experimentos. Se mantuvo su ciclo de vida normal, se les retiró la alimentación 24 horas antes del experimento y el agua se mantuvo *at libitum*.

Los animales se dividieron de forma aleatoria en tres grupos: Grupo 1: *control* (n=5), no sometidas al evento isquémico; Grupo 2: *ratas tratadas con aprotinina* (n=5), donde: 2c, porción del hígado no sometida a I/R y 2: porción de hígado sometida a I/R. Grupo 3: *ratas no tratadas* (n=12), donde: 3c: porción de hígado no sometido a I/R y 3: porción de hígado sometida a I/R.

Procedimiento experimental:

La isquemia del hígado fue inducida por oclusión con *neuroclips* de las ramas de la arteria hepática que irrigan los lóbulos anterior e izquierdo del hígado. Después de dos horas de isquemia, se retiraron los *neuroclips* y se siguió la reperfusión por una hora.

En el Grupo 2 se aplicaron dos dosis de aprotinina a razón de 10000 UIC/kg peso corporal, intravenoso. La primera dosis fue administrada antes de la isquemia, y la segunda previo la reperfusión. En el Grupo 3 se administró solución de NaCl 0.09% a razón del mismo volumen de aprotinina utilizado en el Grupo 2.

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena cava inferior después del evento I/R. Los sueros obtenidos se mantuvieron a 4°C. Los lóbulos del hígado se extrajeron inmediatamente después de la toma de muestra de sangre. Con cada lóbulo hepático se realizó un homogeneizado en Tampón [Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.8, EDTA 1 mmol/L, DTT 1 mmol/L, PMSF 1 mmol/L] a 4°C, a razón de dos volúmenes por gramo de tejido. Las muestras de tejido se tomaron de 1 cm³, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

Métodos de determinación.

La concentración de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico, expresada como lipoperóxidos (Lpx) se determinó en 100 mL de plasma mediante un método colorimétrico basado en la reacción con el ácido tiobarbitúrico, previa desproteinización de la muestra en medio ácido. Después de la extracción con n-butanol se procedió a la lectura de la absorbancia de la capa orgánica a 532 nm. Se expresó la concentración en pmol/mg de tejido. La actividad fosfolipasa A₂ (FLA₂) se cuantificó a partir de la diferencia

de absorbancia a 578 nm registrada a los 15 y 60 segundos de incubación de la muestra con fosfatidilcolina en medio alcalino. La actividad enzimática se expresó en mU/mg de proteínas totales.

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó mediante un método basado en la inhibición de la autooxidación del pirogalol por esta enzima. La actividad se expresa en U/mg de proteínas totales. La actividad catalasa (CAT) se cuantificó mediante un método cinético basado en el descenso de la absorbancia del H₂O₂ a 240 nm. La actividad se expresó en U/mg de proteínas totales.

Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva y análisis de varianza, nivel de significación p<0.05.

RESULTADOS

En la *Tabla 1* se presenta la supervivencia de las ratas sometidas a un evento agudo de I/R en hígado tratadas y no tratadas con aprotinina. En el grupo de animales no

Grupos	Animales vivos	Animales muertos	Total	% supervivencia
1	5		5	100
2	5		5	100
3	5	7	12	42
Total	15	7	22	-

Tabla 1. Supervivencia de las ratas sometidas a un evento agudo de isquemia-reperfusión de hígado, tratadas y no tratadas con aprotinina.

tratados, sometido al evento I/R, siete animales no sobrevivieron, lo que representa una mortalidad del 58%. En

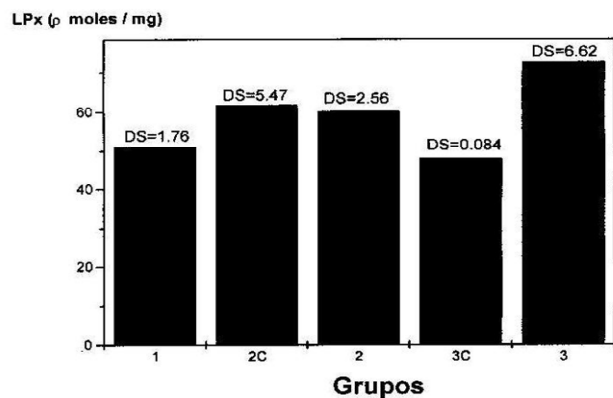


Figura 1. Niveles de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (LPx) en hígados de ratas.

cambio, en el grupo sometido a I/R tratado con aprotinina todas las ratas sobrevivieron.

Los valores correspondientes a las variables bioquímicas del estrés oxidativo estudiadas en las muestras de hígado de rata en los diferentes grupos experimentales se representan en las Figuras 1-4. La concentración de Lpx es superior en el Grupo no tratado con aprotinina (Grupo 3) (Figura 1). Si bien en los grupos 2c y 2 los valores son ligeramente superiores al control, en general el comporta-

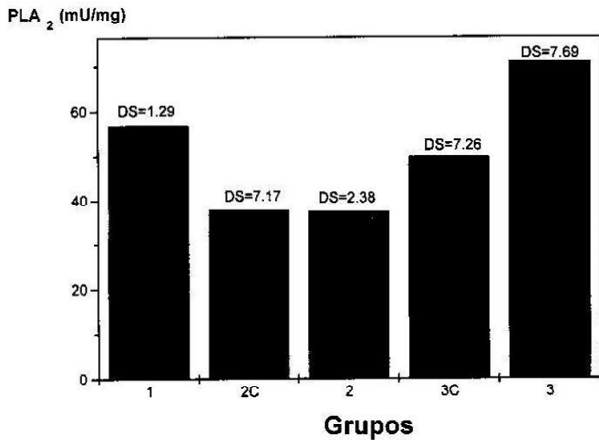


Figura 2. Actividad fosfolipasa A₂ en hígados de ratas sometidos a un evento agudo de I/R, tratadas y no tratadas con aprotinina.

miento de Lpx en 1, 2c, 2 y 3c es similar entre ellos. En la Figura 2 se representa la actividad fosfolipasa A₂. La actividad de esta enzima en el Grupo 3 es superior a su control 3c y al grupo 1. En los Grupos 2c y 2 la actividad es similar entre ellos e inferior a los Grupos 1, 3c y 3. La actividad SOD en los Grupos 2 tiende a disminuir en

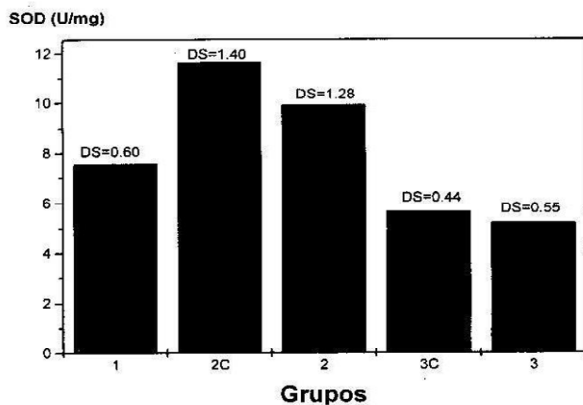


Figura 3. Actividad SOD en hígados de ratas sometidos a un evento agudo de I/R, tratadas y no tratadas con aprotinina.

relación con el 2c, pero superior al grupo control. Sin embargo, la actividad de esta enzima es similar en los grupos 3 y 3c, e inferior en estos grupos en relación con el Grupo 1 y 2 (Figura 3). En relación con la actividad CAT (Figura 4) se observa que los grupos 1, 2c, 2 y 3c tienen un comportamiento similar, diferente al Grupo

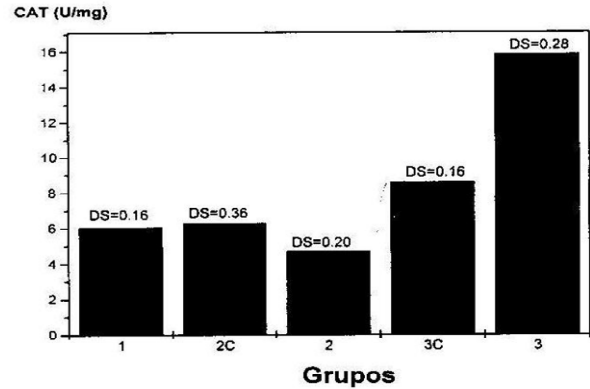


Figura 4. Actividad CAT en hígados de ratas sometidos a un evento agudo de I/R, tratadas y no tratadas con aprotinina.

sometido a I/R y no tratado con aprotinina, donde la actividad es superior en relación con los anteriores.

En la Figura 5 se aprecia que en el tejido no tratado con aprotinina hay una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos y las células sinusoidales, lo que no se observó en los hígados controles ni en los tratados con aprotinina. La presencia del citoplasma vacuolado es un signo de daño reversible durante la I/R hepática.

DISCUSION

En un período de hipoperfusión e isquemia, la depleción energética es responsable de una cascada de eventos moleculares que conducen a la disfunción celular. Las consecuencias fundamentales derivan, entre otros mecanismos, del daño oxidativo causado por el incremento de especies reactivas del oxígeno y de la activación de sistemas enzimáticos como las fosfolipasas y las proteasas.

Durante la isquemia el ATP se degrada en las células endoteliales y parenquimatosas a ADP y AMP. Si la falta de oxígeno se prolonga el AMP se metaboliza a hipoxantina. La reperfusión garantiza el aporte de oxígeno necesario para restablecer la actividad metabólica normal, pero a su vez es el factor desencadenante de un incremento del daño celular. La llegada del oxígeno favorece la producción de ERO que se inicia con la formación del radical superóxido por la xantina oxidasa o los polimorfonucleares (PMN) activados (14). Como consecuencia de la formación del anión superóxido se generan otras especies reactivas que en su conjunto producen oxidación de las biomoléculas y, en consecuencia, el daño celular.

Los resultados de este trabajo evidencian un aumento en la peroxidación lipídica en el grupo I/R no tratado, lo que coincide con otros reportes en los que se reconoce que durante un evento de isquemia/reperfusión, en los lóbulos hepáticos de rata, así como en otros órganos, se produce un incremento en la concentración de productos de la peroxidación lipídica, lo que sugiere la importancia de este mecanismo como mediador del daño a este tejido. En

estudios en los que se ha sometido el tejido hepático de conejo a isquemia moderada se han encontrado altos niveles de lipoperóxidos (15), resultado que se corresponde con el incremento de malonildialdehído en plasma y en células endoteliales sinusoidales, reportado por otros autores (16,17).

La activación, adhesión y diapédesis de los PMN se produce a través de mecanismos proteolíticos vinculados con proteasas liberadas de los propios PMN, así como por células endoteliales. La activación de PMN y células endoteliales constituyen fuentes generadoras de ERO en I/R (14,18). En el grupo tratado con aprotinina la concentración de Lpx es menor en relación con los no tratados. Este comportamiento responde a la disminución en la generación de ERO debido a la inhibición de los mecanismos de activación de PMN en I/R.

Los valores de Lpx en 2c y 2 son similares a 1 y 3c por lo que constituyen un indicador indirecto de la inhibición que ejerce la aprotinina sobre mecanismos de generación de ERO en este modelo.

Las paradojas del O_2 y del Ca^{2+} desempeñan un papel importante en el daño ocasionado por la I/R. Se ha planteado que los desbalances en los niveles intracelulares de Ca^{2+} producen efectos deletéreos sobre la viabilidad de las células del parénquima hepático después de la I/R.

La aprotinina produjo una disminución en la actividad fosfolipasa A_2 en los animales del grupo 2 (tratados y sometidos a isquemia/reperfusión), en comparación con los no tratados con aprotinina; lo que pudiera estar relacionado con la inhibición directa, por parte de la aprotinina, que impide la oligomerización de la fosfolipasa A_2 , o de manera indirecta a través de una menor formación de peróxidos lipídicos derivados de fosfolípidos de la membrana. Por otra parte, se conoce que existe una isoenzima citosólica de la FLA_2 , inducible por el factor de transcripción nuclear κB , cuya activación se verifica en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica bajo la acción de las ERO. El efecto protector de la aprotinina en relación con la FLA_2 puede estar vinculado entonces a una inhibición de su isoforma inducible. Además, puede estar relacionada a la inactivación a nivel de una o varias enzimas que catalizan las transformaciones ulteriores del ácido araquidónico y cuyos productos actúan disminuyendo la perfusión hística (19).

La actividad de las enzimas del sistema antioxidante da una medida del mecanismo de protección, adaptación y recambio celular durante el estrés oxidativo. Se ha reportado la disminución de la actividad SOD extracelular en ratas sometidas a oclusión porto-cava, disminución que puede deberse a la atrofia de los hepatocitos durante este evento (20).

La SOD puede ser inactivada por el H_2O_2 , el producto de su reacción. Si se tiene en cuenta que la I/R provoca daño a las diferentes células del hígado, y consecuentemente se genera gran cantidad de H_2O_2 por diferentes fuentes, es posible explicar la disminución de la actividad SOD y el

aumento de la actividad CAT en el Grupo 3 (no tratado con aprotinina) por este mecanismo, lo que no se observa en los grupos control y tratado.

La administración de superóxido dismutasa recombinante, una enzima con actividad antioxidante, ha sido muy prometedora en modelos animales sometidos a estos eventos, y se ha planteado que la administración antes de la reperfusión en transplantes renales disminuye la incidencia de rechazos e incrementa el período de vida del individuo (21).

En relación al comportamiento de la actividad CAT se observó que en el hígado de conejo sometido a un evento de isquemia moderada por 24 horas se incrementó la actividad de esta enzima (15). La CAT tiene mayor afinidad por altas concentraciones de su sustrato, el H_2O_2 formado por dismutación del superóxido en presencia de la SOD. La alta concentración de H_2O_2 formado en estas condiciones, así como la probable disminución en la actividad glutatión peroxidasa por baja disponibilidad de glutatión reducido en condiciones I/R, igualmente pueden conducir a un incremento en la actividad CAT en el Grupo 3, no tratado con aprotinina. La actividad CAT en el Grupo 2, similar a los grupos 1, 2c y 3c es una evidencia indirecta del efecto protector de la aprotinina en el evento I/R hepática.

El patrón de aumento de la síntesis de proteínas revela tres fases cinéticas de adaptación de células de mamíferos frente al daño por H_2O_2 : fase temprana de 0 – 4 horas; fase media, de 4 – 8 horas, y fase tardía, de 8 – 15 horas. En estas condiciones se induce la expresión de la CAT, entre otras proteínas; mecanismo que pudiera explicar en parte el por qué del aumento en la actividad de la enzima en los animales no tratados con aprotinina (20).

En un estudio de Goudeau y colaboradores se detectó una disminución del estrés oxidativo, reducción en la respuesta inflamatoria y mejor salida clínica cuando a los pacientes sometidos a bypass cardiopulmonar se les optimizó el tratamiento previo al acto quirúrgico con heparina, aprotinina y hemofiltración (22).

Los resultados presentados en la *Tabla 1* evidencian en efecto protector de la aprotinina en el daño agudo por I/R parcial en hígado de rata a través de la inhibición de los mecanismos de generación de ERO.

Los efectos beneficiosos del tratamiento con aprotinina previo isquemia y reperfusión en hígado de rata pudieran asociarse a la inhibición de los eventos iniciales que conducen a la generación de ERO a través de su actividad antiproteásica, y se manifiesta de forma indirecta mediante la disminución de la peroxidación lipídica en el tejido dañado con la consiguiente disminución de la respuesta inflamatoria sistémica.

BIBLIOGRAFIA

1. [Curello S](#), [Ceconi C](#), [de Giuli F](#), [Panzali AF](#), [Milanesi B](#), [Calarco M](#), et al. Oxidative stress during reperfusion of human hearts: potential sources of oxygen free radicals. *Cardiovasc Res* 1995;29(1):118-25.
2. Yamazaki I, Soma T, Ichikawa Y. Usefulness of allopurinol for prevention of myocardial reperfusion injury in open heart surgery. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1995;43(1):26-31.
3. Sanderud J, Oroszlan G, Bjoro K. D-penicillamine inhibits the action of reactive oxygen species in the pig pulmonary circulation. *J Perinat Med* 1995;23(5):385-93
4. [Clermont G](#), [Vergely C](#), [Jazayeri S](#), [Lahet JJ](#), [Goudeau JJ](#), [Lecour S](#), et al. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002;96(1):80-7.
5. Levi M, [Cromheecke ME](#), [de Jonge E](#), [Prins MH](#), [de Mol BJ](#), [Briet E](#), et al. Pharmacological strategies to decrease excessive blood loss in cardiac surgery: a meta-analysis of clinically relevant endpoints. *Lancet* 1999;354(9194):1940-7
6. Broche F, Romero A, Céspedes E, Peña M, García JC. Aprotinin mediated antioxidant effect in cardiac surgery with mechanical cardiorespiratory support. *J Cardiovasc Surg (Torino)*2002;43(4):429-36.
7. [Prufer D](#), [Buerke U](#), [Khalil M](#), [Dahm M](#), [Darius H](#), [Oelert H](#), et al. Cardioprotective effects of the serine protease inhibitor aprotinin after regional ischemia and reperfusion on the beating heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124(5):942-9.
8. [Karaca P](#), [Konuralp C](#), [Enc Y](#), [Suzer A](#), [Sokullu O](#), [Ayoglu U](#), et al. Cardioprotective effect of aprotinin on myocardial ischemia/reperfusion injury during cardiopulmonary bypass. *Circ J* 2006;70(11):1432-6.
9. [Peters DC](#), [Noble S](#). Aprotinin: an update of its pharmacology and therapeutic use in open heart surgery and coronary artery bypass surgery. *Drugs* 1999;57(2):233-60.
10. [Sodha NR](#), [Boodhwani M](#), [Bianchi C](#), [Ramlawi B](#), [Sellke FW](#). Aprotinin in cardiac surgery. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2006;4(2):151-60.
11. [Augoustides JG](#). Con: aprotinin should not be used in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2007;21(2):302-4.
12. [Asimakopoulos G](#). Systemic inflammation and cardiac surgery: an update. *Perfusion* 2001;16(5):353-60.
13. [Donahue MA](#), [Price PM](#). Aprotinin: antifibrinolytic and anti-inflammatory mechanisms of action in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Dynamics* 2002;13(3):16-23
14. Llanes JR, Cancio M, Solis M, Rodriguez F, Llorente M, Rivas W, et al. Variaciones de los leucocitos polimorfonucleares durante los periodos de isquemia y reperfusion de la cirugía coronaria. *Rev Latinoamer Technol Extracorp* 2002;2(2).
15. Proulx M, Du Sovich P. Acute moderate hypoxia in conscious rabbits, effect on hepatic cytochrome P450 and on reactive oxygen species. *J Pharmacol* 1995;47:239-47
16. Auer T, Khoschsorur GA, Rabl H, Iberer F, Petutschnigg B, Wasler, et al. Detection of lipid peroxidation products by malondialdehyde in organ transplantation. *Transplant Proc* 1995;27(5):2749-51.
17. [Blanc MC](#), [Housset C](#), [Lasnier E](#), [Rey C](#), [Capeau J](#), [Giboudeau J](#), et al. Direct cytotoxicity of hypoxia-reoxygenation towards sinusoidal endothelial cells in the rat. *Liver*. 1999;19(1):42-9.
18. Chello M, Mastroberto P, Romano R, Ascione R, Pantoleo D, de Amicis U. Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass: a randomized comparison of hypothermia and normothermia circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11:162-8
19. Siegmund B, [Schluter KD](#), [Piper HM](#). Calcium and the oxygen paradox. *Cardiovasc Res* 1993;27(10):1778-83.
20. Benoit JN, Grisham MB, Mesh C. Hepatic oxidant and antioxidant system in porta cava shunted rats. *J Hepatol* 1992;14:253-8.
21. Ischemia/Reperfusion Injury. Cytokine bulletin. Published by R&D System. Spring 1996, pp2
[Goudeau JJ](#), [Clermont G](#), [Guillery O](#), [Lemaire-Ewing S](#), [Musat A](#), [Vernet M](#), et al. In high-risk patients, combination of antiinflammatory procedures during cardiopulmonary bypass can reduce incidences of inflammation and oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(1):39-45.