

CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO CEREBRAL EN RATAS EXPUESTAS A UN PROTOCOLO DE HIPOXIA NORMOBÁRICA SEVERA

Jeimy A. Giraldo, Débora Coímbra, Ramón Rama

Departamento de Fisiología e Inmunología. Universidad de Barcelona (España)

INTRODUCCIÓN

La hipoxia es un término que hace referencia a los niveles bajos de presión de oxígeno; esto indica que su origen puede incluir una amplia gama de situaciones y normalmente necesita ser definido mediante el uso de limitadores específicos. En general, la hipoxia describe una presión de oxígeno inferior a la presión de oxígeno atmosférico normal (aprox. 21 % del contenido de la atmósfera al nivel del mar). El grado de hipoxia ha tenido muchos descriptores, sin embargo, muchos investigadores refieren tres grados (leve, moderada y severa), si bien aún no se ha determinado el límite entre cada una de ellas; a pesar de lo anterior se han hecho aproximaciones en donde, si la presión arterial de oxígeno (PaO_2) se encuentra por debajo de los valores normales, pero por encima de 50 Torr, se considera hipoxia leve, pues el sistema puede realizar compensaciones para seguir respondiendo de manera normal y la función es relativamente inalterada a las demandas; El equivalente de 10% de O_2 normobárico o una altitud de ~5,000 m sobre el nivel del mar, es el límite para la hipoxia leve. Si la PaO_2 presenta valores entre 50 y 35 Torr se considera hipoxia moderada. Este estadio no se asocia con daños neurológicos permanentes e irreversibles, pero si puede presentarse alteraciones cognitivas; finalmente si la presión disminuye por debajo de 35 Torr se puede hablar de hipoxia severa en donde el individuo sufre pérdida de consciencia, puede llegar a estado de coma y presentar daño neurológico grave e irreversible, incluso la muerte. Aunque los resultados no son completamente claros, la hipoxia leve no está asociada con un daño neuronal permanente, pero los grados moderado y severo de hipoxia llevan a la pérdida neuronal en un grado dependiente de la duración y del grado de exposición. Una segunda clasificación comprende la hipoxia crónica y aguda, en donde la primera hace referencia a exposiciones a hipoxia durante semanas y meses; mientras que la aguda ocurre durante un intervalo desde unos pocos minutos a horas e incluso días (Carbonell y Rama, 2009). La condición de hipoxia puede ser producida disminuyendo la fracción de oxígeno en la mezcla de gas inspirado, "hipoxia normobárica".

Varios sistemas están actualmente disponibles que permiten controlar la composición de los gases en "cámaras normobáricas. La hipoxia puede también ser producida disminuyendo el valor de la presión atmosférica, "hipoxia hipobárica". Este tipo de hipoxia puede ser producida ya naturalmente por ascensión a altitud o en "cámaras hipobáricas". Estudios recientes confirman que exposiciones de igual duración y grado de hipoxia, tienen el mismo efecto con independencia de si son a hipoxia normobárica que hipobárica. Nosotros aquí usaremos hipoxia normobárica severa (7% de O₂) aguda (7 h de exposición). Para este proyecto consideramos la hipoxia normobárica como la disminución de la presión parcial de oxígeno manteniendo normal la presión atmosférica.

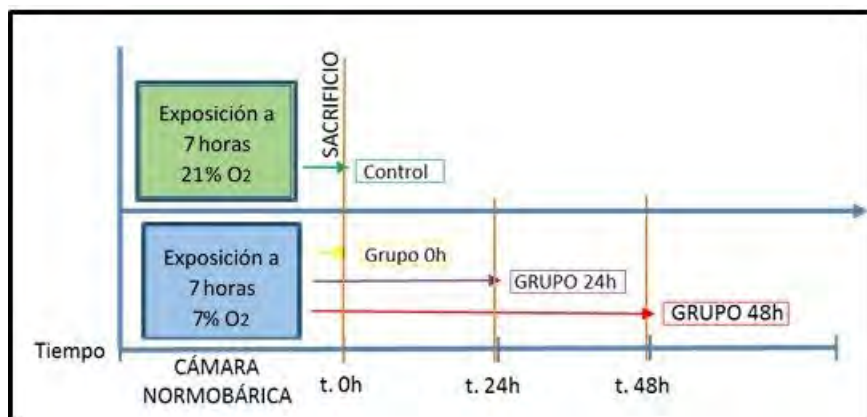
En condiciones de hipoxia severa –concentración parcial de oxígeno por debajo del 8%- y dependiendo de la duración, los mecanismos de transporte de oxígeno a los tejidos pueden resultar insuficientes, causando una hipoxia tisular. En estas condiciones, el déficit de oxígeno puede afectar a la síntesis de ATP por la mitocondria.

Durante el proceso normal de la síntesis de ATP por la cadena de respiración mitocondrial se generan radicales libres, especialmente los radicales superóxido, el radical hidroxilo y óxido nítrico. Estos radicales, si no son neutralizados pueden dañar a moléculas lipídicas y proteínas de la membrana celular y al DNA. En condiciones fisiológicas estos radicales son neutralizados por antioxidantes celulares, principalmente la SOD, catalasas y glutatión. Si se rompe esta homeostasis antioxidantes/oxidantes, con la presencia excesiva de oxidantes, la célula puede entrar en un proceso de estrés oxidativo y por tanto entrar en riesgo de apoptosis.

La hipoxia afecta principalmente a las mitocondria y su funcionamiento. El estrés oxidativo activa una cadena de mecanismos bioquímicos con modificaciones en la expresión de componentes de la familia Bcl-2 que causan la salida del Factor inductor de Apoptosis (AIF) de la mitocondria hacia el núcleo y la liberación del citocromo c al citoplasma que contribuyen a la formación del apoptosoma. La formación del apoptosoma activa a las caspasas 3 (proteasa efectora) y se amplifica una respuesta apoptótica en puntos diana como membrana, núcleo y mitocondria que pueden causar la muerte de las neuronas.

El cerebro es un órgano especialmente vulnerable a la hipoxia. Las neuronas para realizar sus funciones requieren un continuo aporte de oxígeno y glucosa para obtener la energía (ATP) necesaria para el mantenimiento de los gradientes iónicos y la síntesis de neurotransmisores, principalmente mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial en la que el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. La elevada tasa metabólica del cerebro queda demostrada si tenemos en cuenta que el cerebro con un 2 % del peso corporal consume aproximadamente el 20% del consumo total corporal de oxígeno. Este elevado consumo de oxígeno, con más del 90% utilizado por la mitocondria unido al abundante

contenido de lípidos en las membranas neuronales, hacen al cerebro muy vulnerable al estrés oxidativo. En el presente trabajo nos propusimos caracterizar a nivel cerebral, el efecto de un protocolo de hipoxia normobárica en ratas cuando respiran aire con 7% de O₂ durante 7h continuas, seguido de un periodo de re-oxigenación respirando 21% de O₂ de 0h, 24h y 48h. Para ello, como objetivos específicos nos planteamos: a) Determinar la expresión de HIF-1 en el cerebro, como un indicador de hipoxia cerebral, generada por la hipoxia normobárica aplicada dentro del protocolo; b) Determinar la posible inducción de estrés oxidativo, mediante la valoración de marcadores de estrés: niveles de oxidación de proteínas, lípidos y nitratos; c) Evaluar la expresión de proteínas apoptóticas, AIF y caspasas-3 a nivel cerebral de las ratas expuestas a un tratamiento de hipoxia normobárica.



La fig 1 muestra el protocolo empleado. Se expusieron 3 grupos a hipoxia normobárica durante 7h. y luego se sacrificaron 5 animales justo después de salir de la cámara normobárica y los otros dos grupos a las 24 y 48 horas. El grupo control estuvo expuesto a normoxia dentro de la cámara y se sacrificó después de las 7 horas.

MATERIAL Y MÉTODO

Ratas Sprague-Dawley machos formando 4 grupos de ratas, cada uno con 5 animales, que se mantuvieron (2-3 por caja) en ciclos de 12h luz y oscuridad a temperatura ambiente de 22±1°C con libre acceso a la de alimentación y agua; su peso corporal fluctuó entre 240-280 gramos. El protocolo experimental de este estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético Institucional para el Cuidado, Investigación y Experimentación con Animales de la Universidad de Barcelona de acuerdo con las directrices de la Comunidad Europea dando cumplimiento a la normativa del Consejo Directivo de la Comunidad Económica Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) publicado en "Principales cuidados de los animales de laboratorio" (Publicación NIH No. 85-23, revisada en 1985) y en las Ley del Estado

español (Ley 32 del 7 de noviembre de 2007), para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

Grupo I (Control): Ratas puestas en cámara normobárica durante respirando aire normal durante 7 horas. No fueron expuestas a hipoxia. Grupo II (**0h**), III (**24h**) y IV (**48h**): Ratas expuestas a hipoxia con FiO_2 7% en cámara normobárica (Nitrógeno 93% - Oxígeno 7%) durante una sesión de 6 horas. Al terminar las 6 horas de exposición, los animales del grupo II eran inmediatamente decapitados, los del grupo III eran decapitados a las 24 horas y los del grupo IV a las 48 horas. La fig. 1 muestra un esquema del protocolo experimental. La extracción del tejido cerebral se realizó justo después de cada uno de los tiempos de supervivencia respectivos a cada grupo. Inmediatamente después de este procedimiento cada cerebro fue pesado y lavado con KCL frío a 0.154 M y sumergidos en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80°C hasta el momento de las posteriores pruebas. Para las valoraciones inmunohistoquímicos las ratas se perfundieron al momento del sacrificio con una solución de paraformaldehído a 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M (PB 0.1M; PFA 4%). Posterior a esto cada cerebro fue extraído y fijado en la misma solución de perfusión durante la noche a 4°C . Se crio-protegieron con solución de sacarosa a 30% en paraformaldehído a 4% en PBO 1M durante 48 horas a 4°C . Seguidamente se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser seccionados. Se obtuvieron cortes coronales de $40\ \mu\text{m}$ a través del criostato (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las secciones fueron almacenadas a -20°C en solución crio-protectora (glicerol 30%, etilenglicol 30% en PB 0.1M) hasta el momento de la prueba.

Para las valoraciones bioquímicas muestras de tejido cerebral, después de haber pasado por el lavado con KCL frío a 0.154M en el momento de la extracción y congelado a -80°C , se homogenizó mecánicamente con un baño de nitrógeno líquido en un mortero usando un homogenizador de vidrio con capacidad para 5ml. Cada cerebro con sus respectivos hemisferios (1gr) fueron tratados por separado y descongelados en tampón de lisis (Tris-HCl: 10mM, 320 mM de sucrosa, 10mM de EDTA, solución a un pH de 7,5) y 1 tableta/50 ml del cóctel de inhibidores de proteasas (SC-29130 de Santa Cruz Biotechnology, California, USA): (Leupeptina 2ug/ml, pepstatina, 2ug/ml, PMSF 1 mM, 1 mM Navon, aprotinina, 1.7mg/ml).

La concentración de proteínas en cada muestra de homogenado se cuantificó según el método de Bradford (Bradford, 1976) usando γ -globulina para la construcción de la recta standard. Los valores se determinaron por colorimetría de flujo midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Tekan).

Detección de oxidación lipídica Para obtener los niveles de peroxidación lipídica se midió el nivel de Melandialdehído (MDA) existente en el homogenado previamente preparado. El

MDA reacciona con el Ácido Thiobarbitúrico a través del protocolo de detección de sustancias unidas al ácido 2- Thiobarbitúrico (TBARs). EL MDA y TBA en condiciones de acidez y con temperaturas altas generan un fuerte enlace reflejado en un aducto cromógeno y fluorescente de color rosa (Estepa y col., 2001, Fassiano, 2012). La lectura de los resultados se hizo a través de fluorometría con una longitud de emisión de onda de 515 nm y 548 nm de longitud de excitación.

Detección de oxidación de proteínas. La oxidación de proteínas fue llevada a cabo mediante el uso de cloramina-T (Barsotti y col., 2011). Cada muestra se incubó por 5 minutos con un **reactivo "iniciador" que comienza la reacción colorimétrica; después se agrega ácido acético** y se realiza la lectura a 340nm. Los datos se expresaron en μM de Cloramina-T y el análisis en nmol de proteínas oxidadas por mg de proteínas totales.

Formación de óxido nítrico: Valoración de nitritos y nitratos (NOx). Para la valoración de los niveles de óxido nítrico, debido a su rápida transformación biológica en nitrito y nitrato se determina valorando la acumulación estable de estos derivados mediante el reactivo de Griess (Hortelano 1995). Los resultados son expresados en $\mu\text{mol/L}$.

Detección de expresión de proteínas por Western Blot.

Después de haber pasado por el lavado con KCL frío a 0.154M en el momento de la extracción y congelado a -80°C , en su momento, el tejido se homogenizó mecánicamente con un baño de nitrógeno líquido en un mortero usando un homogenizador de vidrio con capacidad para 5ml. Alícuotas de homogenado tratado con tampón de lisis conteniendo inhibidores de proteínas se limpiaron por centrifugación a 12.000 g durante 20 min a 4°C . y el sobrenadante con proteínas fue separado en alícuotas congeladas a -80°C hasta el análisis de Western Blott.

A alícuotas conteniendo 30 μg de proteínas 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-mercaptoetanol, correspondientes a 10% el peso húmedo de la muestra. Las muestras pasaron por un proceso de mezcla, ebullición en baño seco (5 minutos) y carga en pocillos de geles 15% (AIF y NFkB), 12% (β -Actina y Caspasas-3) de SDS-poliacrilamida.

Para la preparación de dichos geles se mezcló con la poliacrilamida al 30%, solución amortiguadora SDS al 10%, 1,5 M de Tris - HCl (pH 8.8 para running buffer y pH 6,8 para stacking buffer), 10% de Amonio-Persulfato, Temed y Agua destilada. Después de 45 minutos la mezcla polimerizó en cassetes de vidrio (Bio Rad). Cada gel se sometió a un proceso de electroforesis durante 2 horas a 125 V, en donde previamente se había agregado un marcador de peso molecular (Biorad). Las proteínas se transfirieron por electroforesis a membranas (activadas en Metanol al 70%) de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore,

Bedford, MA, EE.UU.) durante 1,5 horas a 100mA. Se utilizó la proteína β -Actina como control de carga proteica de cada muestra

El protocolo de Western Blot incluyó: (a) bloqueo de sitios de unión inespecíficos en la membrana con solución de bloqueo (leche descremada 5% - solución tamponada con fosfato con Tween20 a 0.1% (TBST; pH 7.6) durante 40 minutos a temperatura ambiente. (b) Incubación en las membranas del anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (1:400); anti-Caspasas 3 (1:1000), anti-NFkB (1:50000) y policlonal de cabra anti-AIF (1:400) (Santa Cruz, Biotecnología, CA, EE.UU), en TBST durante toda la noche en agitación suave a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente. (c) Incubación de sus respectivos anticuerpos secundarios anti-ratón IgG (1:70000/ 1:35000) biotinilado y anti-IgG de cabra biotinilado (1: 12000) (Señalización Cell Technology, MA, EE.UU.) en TBST durante 1,5 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Entre cada una de las fases se realizaron 3 lavados con solución TBST durante 10 minutos.

Las proteínas se identificaron mediante un sustrato de quimio-luminiscencia utilizando un kit de inmunotransferencia ECL (Señalización Celular) (Clarity o Thermosience) al cual se expusieron las membranas (30 segundos a 1 minuto dependiendo de cada proteína). Cada membrana se colocó en un casete para revelado de filmes de Rayos X con su respectivo film fotosensible durante periodos compendidos entre 30 segundos a 10 minutos antes de realizar el revelado.

Cada placa de revelado exponía un patrón de bandas proteico, los resultados fueron escaneados matices de gris y analizados densitométricamente mediante el software libre Image-J. Los resultados se expresaron como los valores de la media +/- error estándar (ES). Los parámetros analizados presentaron una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Los efectos de la hipoxia sobre los parámetros determinados se examinaron mediante la prueba estadística T-Student; los valores de $P < 0.05$ sobre los valores del grupo control (normoxia) fueron considerados estadísticamente significativos.

Valoraciones inmunohistoquímicas.

El protocolo se realizó en los cortes previamente seccionados **siguiendo el método "Free-Floating"** para la preparación de la muestra; se realizó la inmunodetección de las proteínas Caspasas-3, AIF y NFkB. Cada muestra fue lavada 3 veces por 5 minutos en solución PB 0.1M pH 7.4, retirando la solución crioprotectora y después de cada fase (bloqueo de peroxidasas endógenas, bloqueo general, anticuerpo primario, anticuerpo secundario e incubación ABC terciario) se realizaron 3 lavados con PBS 0.1M.

Para el bloqueo de peroxidasas endógenas se mantuvieron las muestras durante 30 minutos en oscuridad sumergidas en PBS con H_2O_2 0.05% y metanol 10% (iniciando dicha reacción).

El bloqueo general se realizó con solución de bloqueo (PBS-gelatina 0.2% con FBS 10%, 0.2 mM glicina, Tritón X 100 0.1%,) durante 1 hora. Posterior a esto las muestras se sumergieron en solución de bloqueo (FBS 5%) con anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal de ratón anti-Caspasas-3 (1:3000), anti-NFkB (1:400) y policlonal de cabra anti-AIF (1:300) (Santa Cruz Biotecnología, CA, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de los lavados se continuó con la sumersión en solución de bloqueo (FBS 5%) con anticuerpo secundario (anti-ratón IgG y anti-IgG de cabra biotinilados (1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. En la fase de incubación con ABC (avidin-biotin complex) se preparó con 30 minutos de antelación avidina 10 μ L con biotina 10 μ L/mL de PBS (FBS 5%) y se incubaron las muestras durante 1 hora y media a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente para obtener el revelado de la proteína se incubó durante 4 a 10 minutos con solución Diaminobenzidina 0.05% (DAB) y PBS (H₂O₂ 1 μ L/mL). Cada una de las fases anteriores se realizó bajo agitación usando un agitador orbita Titramax 100. Se hizo el montaje de las muestras en los portaobjetos gelatinizados y deshidrataron durante 5 minutos en cada fase (Alcohol 50%, 70%, 90%, 100%, Xilol). Se realizó registro fotográfico en microscopio electrónico con previa visualización en microscopio óptico. Dichas fotografías se compararon cualitativamente con los resultados de la técnica de Western Blott para relacionar los datos pero no se hizo ninguna cuantificación de datos en este escrito.

RESULTADOS

Factor Inducible por Hipoxia HIF-1. HIF actúa como un sensor celular de oxígeno y regula la expresión de proteínas implicadas en un amplio rango de procesos biológicos incluyendo entre otros la neurogénesis, angiogénesis, eritropoyesis, etc., y así permite a las neuronas sobrevivir en condiciones de oxígeno bajas. Los resultados indican que la exposición a la hipoxia causan un aumento significativo de la expresión de HIF-1 con relación a los valores del grupo de normoxia, que se mantiene después de 24 h de respiración en normoxia.

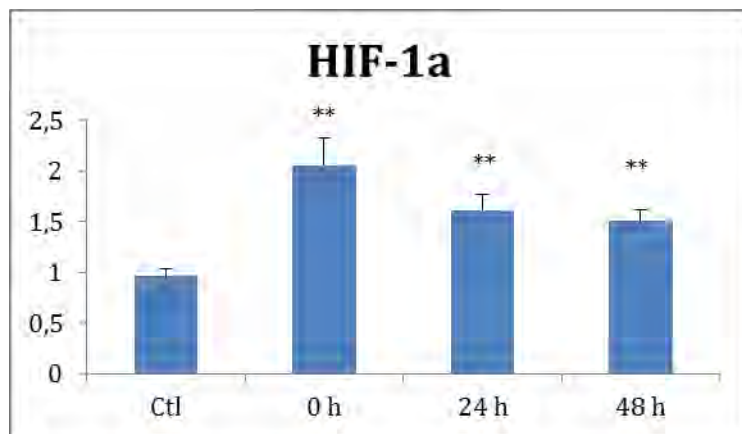


Fig.2. Expresión aumentada de HIF1 α después de una exposición de 7 h al 7 % FIO₂. La máxima expresión se observa al final de la exposición. Los niveles disminuyen progresivamente con el tiempo en normoxia. Los resultados se expresan como unidades relativas de densidad frente al control y como la media \pm SD (n=5). **: P \leq 0,005

Oxidación de Lípidos. Los niveles de TBARs aumentan significativamente con la exposición a la hipoxia. Estos resultados son indicadores del estrés oxidativo causado por la hipoxia aplicada en nuestro protocolo (Fig.3).

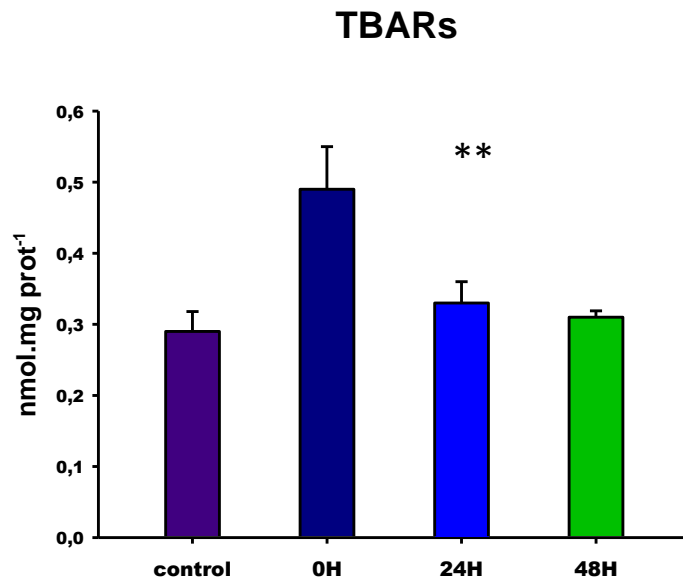


Figura 3

Valoración de la peroxidación lipídica en homogenados de cerebro de rata causada por la exposición a 7% de O₂ durante 7 horas (n=5). Los resultados están expresados en media \pm SD. ** p< 0,05 vs control.

Oxidación de proteínas. Los resultados muestran que la exposición durante 6 h a la hipoxia causa un aumento significativo de los niveles de oxidación de proteínas (Fig. 4). La reoxigenación tanto a las 24 h como a las 48 h muestran una disminución significativa de los niveles de oxidación de las proteínas.

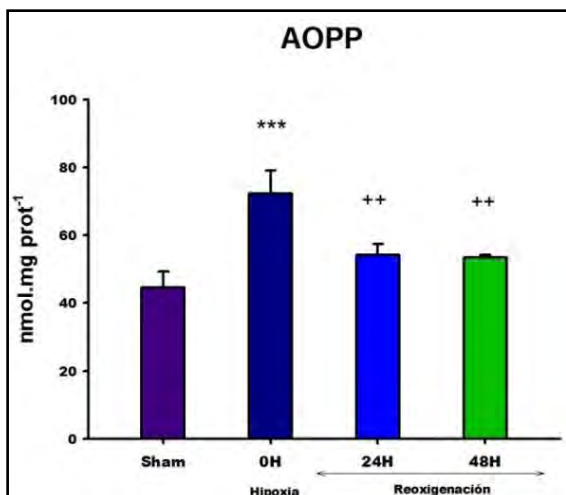


Fig 4. Resultados de la oxidación proteica en cerebro de ratas. Diferencias significativas entre los grupos hipóxicos con el grupo control.

***p<0.05 vs. control; ++ p<0.01 vs 0h

Formación de NO. La hipoxia causa un aumento significativo de la formación de NO por el cerebro (Fig.5). Se observa que el aumento de los niveles de NO siguen aumentando significativamente a las 24 h y 48 h de post-hipoxia.

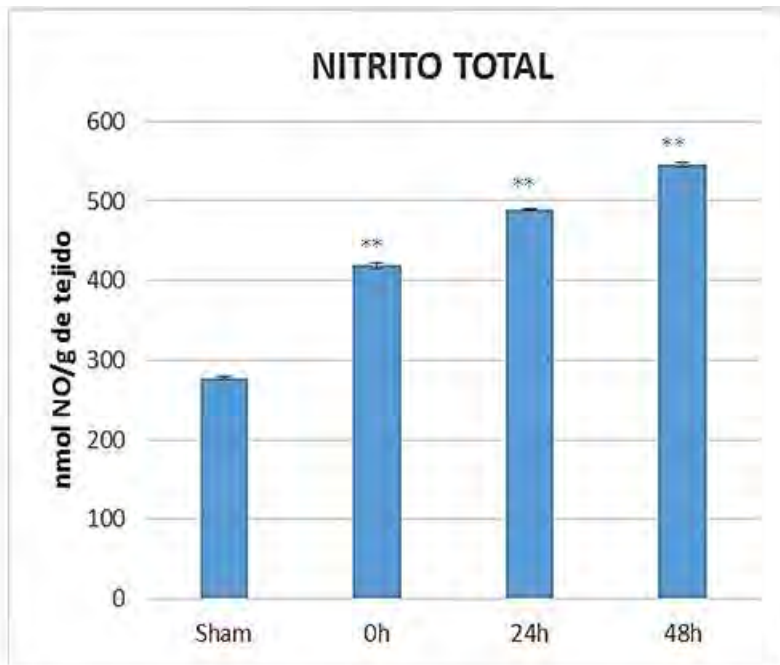


Fig. 5. Concentración de óxido nítrico en tejido cerebral de ratas expuestas a un protocolo de hipoxia normobárica y su posterior reoxigenación. Media \pm SD. nmol/g de tejido. Diferencias significativas ** $p \leq 0.05$ vs. grupo control.

Expresión de caspasa-3. Los resultados muestran que la hipoxia induce un aumento significativo de la expresión de la caspasa-3 en las ratas de los diferentes grupos experimentales cuando son valorados tanto mediante la técnica de Western Blot como mediante inmunohistoquímica, (Fig. 6).

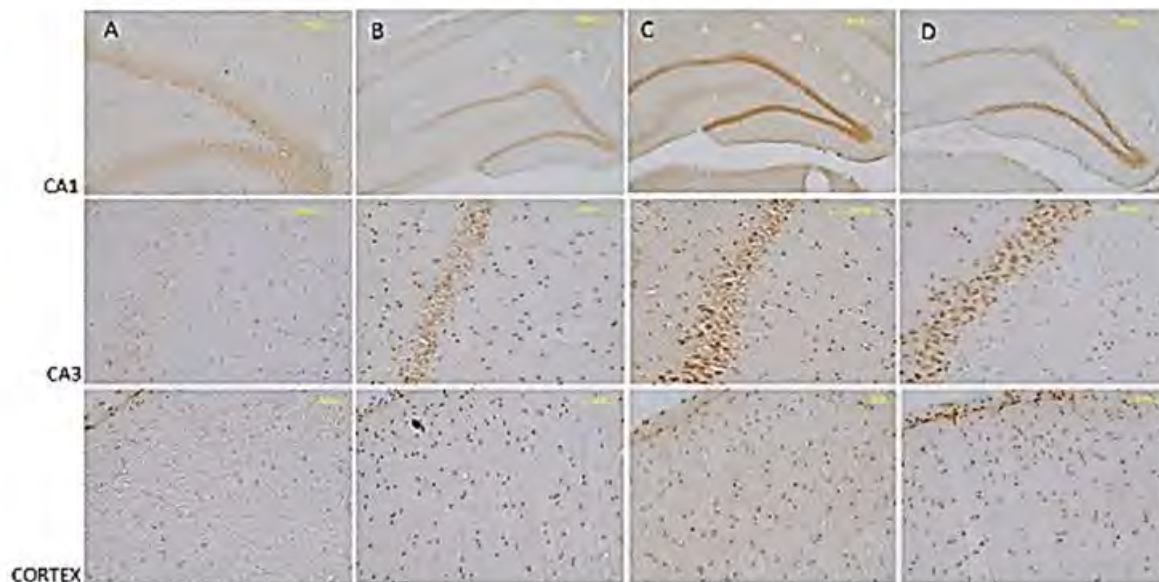
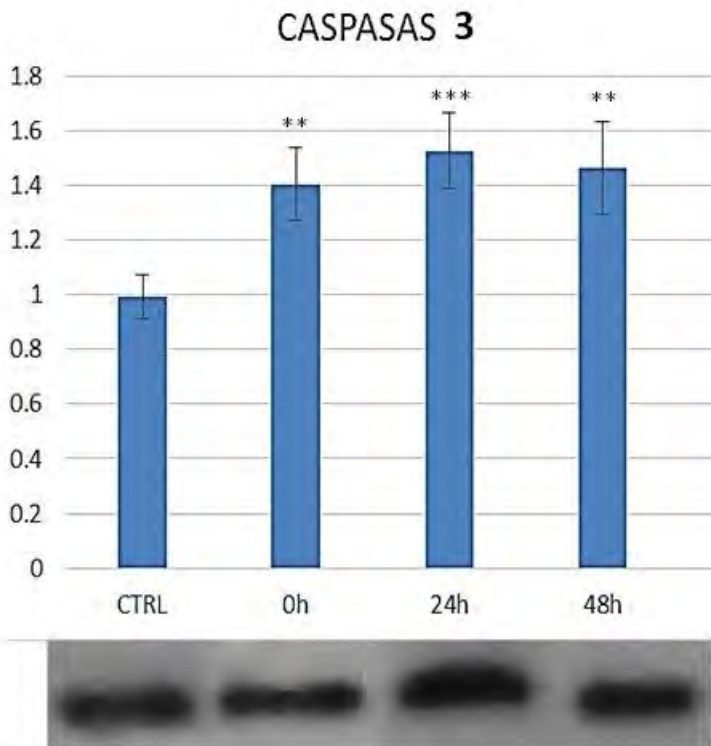


Fig. 6. Caracterización de la expresión de Caspasas 3 en las ratas de los diferentes grupos experimentales (A) control, (B) 0h, (C) 24h, y (D) 48h. En la parte superior se presenta en el panel registros fotográficos de los cortes cerebrales a nivel coronal de las ratas y la expresión de proteína en el hipocampo y corteza. **Hipocampo-CA1 (4X)** ; **CA3 (20X)**- y **en corteza (50X)**. A la derecha, se presenta el gráfico de resultados de la prueba de Western Blot analizados en Image J. Los datos se presentan respecto a la media \pm SD y presentan cambios significativos en todos los grupos. $**p \leq 0.02$ $***p \leq 0.005$ vs control



Factor inductor de apoptosis (AIF). La valoración de la expresión de AIF en los homogenados del cerebro muestran que la exposición a la hipoxia causan un aumento de la expresión de AIF que es significativamente mayor en los cerebros de los animales después de 7 h de hipoxia y 24 h de normoxia. Los datos de las imágenes inmunohistoquímicas confirman la mayor presencia de AIF en el cortex, cuerpo calloso y CA3 de los animales después 7 h de hipoxia y 24 h de normoxia (C). También se observa unos niveles superiores a los animales control (normoxia) en el grupo de animales después de 7 h de hipoxia y 48 h de normoxia.

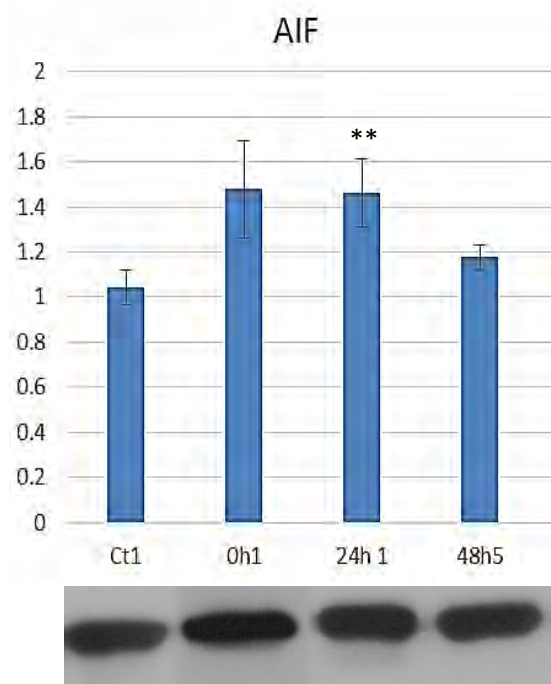
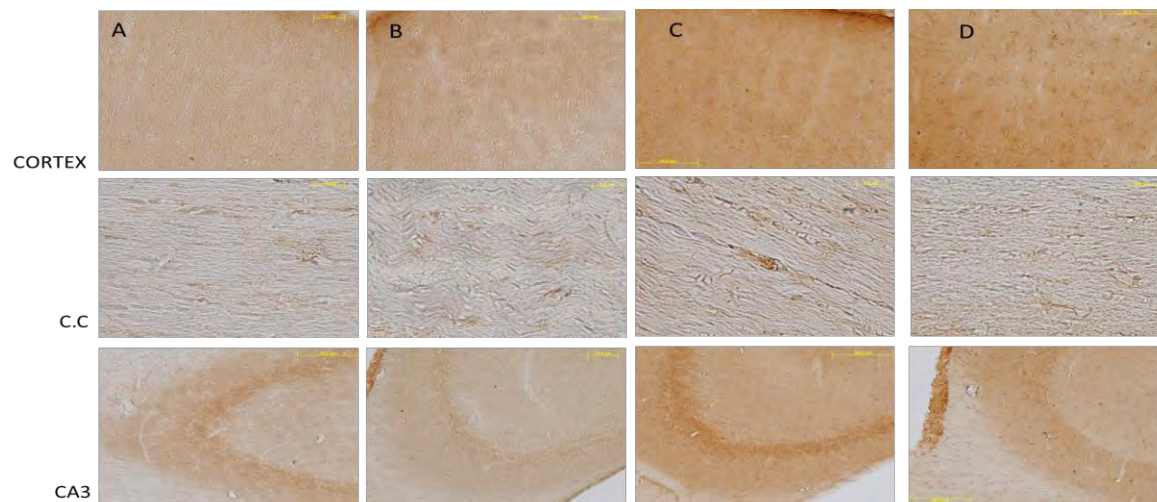


FIG. 7. Caracterización de la expresión de AIF. En la parte superior valoración inmunohistoquímica, de cortes cerebrales a nivel coronal en el cortex (20X), cuerpo calloso (cc) (50X) y CA3 (4X) en ratas control (A), después de 7 horas de hipoxia (B) y de 24 h (C) y 48 h (D) de normoxia. En la parte inferior, valoración por Western Blot. Datos expresados como media \pm SD.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el protocolo usado es adecuado para caracterizar el efecto de la exposición de animales a una situación de hipoxia aguda severa. Así lo indica el aumento de la expresión de los niveles de HIF-1, el factor clave en la respuesta celular a la hipoxia (Caramel 2006; Lee et al. 2007; Maxwell and Salnikow 2004).

El estrés oxidativo está considerado como uno de los procesos que participan en la respuesta a la hipoxia cerebral como consecuencia del déficit de oxígeno que lleva a un aumento de la producción del radical superóxido por la mitocondria, y a la activación de la

óxido nítrico sintetasa (NOS) y la formación de óxido nítrico. Estos radicales pueden actuar directamente sobre componentes estructurales de las membranas de las neuronas, causando la oxidación de lípidos y de proteínas, dañando las membranas celulares o indirectamente activando la cascada apoptótica. El resultado de ambos procesos puede llevar a la muerte de la neurona y al consiguiente daño cerebral. El aumento de la oxidación lipídica, de la oxidación de proteínas y de la formación de derivados del óxido nítrico observada en los cerebros de los animales sometidos a hipoxia demuestran que la exposición durante 6 horas a una hipoxia del 7 % de oxígeno lleva al cerebro a una situación de estrés oxidativo que causa daño en los principales componentes de las membranas celulares.

Junto con la acción directa, los resultados confirman que los radicales libres inducidos por la hipoxia, también activan la vía apoptótica. Entre los principales marcadores de ese mecanismo destacan el aumento de los niveles de AIF y el aumento de la actividad de la caspasa 3. Nuestros resultados muestran que la hipoxia causa un aumento significativo de los niveles de AIF y de la actividad de la caspasa 3 en el cerebro después de la exposición a la hipoxia con valores mayores a después de 24 h de normoxia. Después de 48 h de normoxia, la actividad caspasa 3 vuelve a valores normales. El uso de técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas empleadas para la detección de marcadores apoptóticos confirman que el protocolo de la hipoxia empleado activa mecanismos apoptóticos en los cerebros de los animales sometidos a la hipoxia.

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados observados se puede concluir que el protocolo aplicado de hipoxia normobárica causa hipoxia en el cerebro (aumento de los niveles de HIF). El nivel deficit de oxígeno alcanzado produce en el cerebro una situación de estrés oxidativo que causa daño directo sobre estructuras neuronales (aumento de la oxidación de lípidos y de proteínas y altos niveles de óxido nítrico) e indirecto, mediante la activación de la vía apoptótica (aumento de la formación de AIF y de la caspasa-3).

BIBLIOGRAFIA

- Barsotii A, Fabbi P, Fedele M, y col. (2011). Role of advanced oxidation protein products and Thiol ratio in patient with acute coronary síndromes. Clin Biochem 44:605-611.
- Caramel C. y col. (2006). Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. Medicina (Buenos Aires), 66: 155–164.
- Carbonell T. & Rama R. (2009). Respiratory Hypoxia and Oxidative Stress in the Brain. Is the Endogenous Erythropoietin an Antioxidant?. Current Chemical Biology, 3:238-256.
- Cayman Chemical, 2014. Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit. (780001).

- Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJ, Boscá L. (1995). Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 21:776-786.
- Lee K, Roth R.A. & LaPres J.J. (2007). Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 113:229–246.
- Maxwell P. & Salnikow K. (2004). HIF-1: An oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer biology and therapy*, 3:29–35.