

Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



Original – Andrología-Infertilidad

Cambios bioquímicos en el tejido cavernoso causados por resección unilateral del nervio cavernoso y efectos del ácido alfalipoico en estos cambios

C. Alan^{a,*}, H. Kocoglu^b, A. Resit Ersay^a, H. Anil Kurt^a, Y. Ertung^a y H. Alan^a

^aDepartamento de Urología, Facultad de Medicina, Universidad Onsekiz Mart de Canakkale, Canakkale, Turquía

^bDepartamento de Urología, Hospital Militar de Canakkale, Canakkale, Turquía

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de marzo de 2010

Aceptado el 27 de marzo de 2010

On-line el 8 de junio de 2010

Palabras clave:

Ácido alfa lipoico

Nervio cavernoso

R E S U M E N

Objetivo: Una de las complicaciones más importantes de la prostatectomía radical es la disfunción eréctil. Se pueden producir patrones de agresión oxidativa y cambios apoptóticos en los músculos lisos y en las células endoteliales del cuerpo cavernoso después de neuropraxia o neurectomía. El ácido alfalipoico (AAL) tiene propiedades antioxidantes, ya que elimina radicales libres. En este estudio experimental investigamos los efectos del AAL en la rehabilitación del tejido cavernoso y las fibras con sintasa del óxido nítrico (NOS) en el tejido eréctil.

Materiales y métodos: Se formaron cuatro grupos en este estudio mediante la inclusión de 63 ratas fértiles adultas: 9 en el grupo de control, 18 en el grupo de operación simulada, 18 ratas sometidas a neurectomía unilateral de un segmento de 5 mm del nervio cavernoso (grupo DI) y otras 18 ratas que recibieron AAL después de la neurectomía unilateral (grupo DII). Las evaluaciones se realizaron 3 semanas después de la neurectomía.

Resultados: Determinamos el número de fibras nerviosas que contenían NOS mediante tinción del fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina diaforasa. Según dicha tinción, el grupo DII se recuperó significativamente en comparación con el grupo DI (48,89±19,00 y 17,22±6,67, respectivamente) (p<0,05). La actividad de la superóxido dismutasa disminuyó en los grupos DI y DII (31,42±6,06 y 40,38±4,24 U/g de tejido húmedo). Las concentraciones de nitrito+nitrato aumentaron significativamente en el grupo DI y en el grupo DII (0,52±0,05 y 0,44±0,02 μmol/g de tejido húmedo, respectivamente) en comparación con los otros grupos (p<0,05). No hubo diferencias estadísticas entre los resultados del grupo DI y el grupo DII (p>0,05).

Conclusión: Este estudio confirma que la neurectomía disminuye la presión intracavernosa y el número de fibras con NOS. La neurectomía y el trauma quirúrgico causaron agresión oxidativa en el cuerpo cavernoso de las ratas. Como potente antioxidante, el AAL tiene efectos positivos de regeneración y rehabilitación del tejido cavernoso al disminuir la agresión oxidativa. En este sentido, el AAL ofrece una posible ventaja en la rehabilitación del pene después de la prostatectomía radical.

© 2010 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cabir1@yahoo.com (C. Alan).

Biochemical changes in cavernosal tissue caused by single sided cavernosal nerve resection and the effects of alpha lipoic acid on these changes

A B S T R A C T

Keywords:

Alpha lipoic acid
Cavernosal Nerve

Objective: One of the most important complications of radical prostatectomy operation is erectile dysfunction (ED). Oxidative stress patterns and apoptotic changes may happen in smooth muscles and endothelial cells of corpus cavernosum after neuropraxia or neurectomy. Alpha lipoic acid (ALA) shows its antioxidant properties by eliminating free radicals. In this experimental study we investigated the effects of ALA on rehabilitation of cavernosal tissue and nitric oxide synthase (NOS) containing nerve fibers on erectile tissue. **Materials and methods:** In this study four groups were formed by inclusion of 63 adult fertile rats. Control group (n: 9), sham operation group (n: 18), 18 rats underwent unilateral neurectomy of a 5-mm. segment of the cavernous nerve (group DI) and another 18 rats group which ALA received after unilateral neurectomy (group DII). Assessments were done 3 weeks after neurectomy.

Results: We assessed number of NOS containing nerve fibers via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaphorase staining. According to NADPH diaphorase staining group DII significantly recovered comparing group DI (48.89 ± 19.00 and 17.22 ± 6.67 respectively) ($p < 0.05$). SOD activity is reduced in both; group DI and group DII (31.42 ± 6.06 and 40.38 ± 4.24). Nitrite+nitrate levels were elevated significantly in both group DI and group DII (0.52 ± 0.05 and 0.44 ± 0.02 micromole/gr wet tissue respectively) when compared with other groups ($p < 0.05$). There is no statistical difference between results of group DI and Group DII ($p > 0.05$).

Conclusion: This study confirms that neurectomy caused decrease of intracavernous pressure and number of NOS fibers. Neurectomy and surgical trauma caused oxidative stress in rat corpus cavernosum. As a potent antioxidant ALA has positive effects on cavernosal tissue regeneration and rehabilitation by reducing oxidative stress. In this aspect, ALA may have a potential advantage in penile rehabilitation after radical prostatectomy.

© 2010 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La prostatectomía radical es una intervención que se realiza con frecuencia en la actualidad. Una de las complicaciones más importantes de esta operación es la disfunción eréctil (DE). Después del conocimiento reciente de la neuroanatomía del pene, para evitar esta complicación se han desarrollado intervenciones de prostatectomía radical con preservación de los nervios¹. Este tipo de operación se realizaba casi siempre de forma unilateral en relación con la diseminación del tumor en la próstata. Se pensaba que el otro nervio cavernoso podía estimular el músculo liso y mantener la función eréctil normal². Sin embargo, esta suposición teórica no se ha confirmado en todos los casos y también en la mayor parte de los centros con experiencia la tasa de éxitos apenas llega al 50%. Además, en los casos en que se mantienen ambos nervios cavernosos la tasa de DE llega al 18-60%³. La fisiopatología de la DE relacionada con cirugía pélvica radical puede explicarse por tres causas importantes: la lesión nerviosa, la lesión vascular y las alteraciones de los músculos lisos¹. Hay varias ideas sobre el tipo o el grado de las lesiones causadas por la tracción sobre el nervio o traumatismos similares. Además, se piensa que los traumatismos mínimos también pueden producir una lesión nerviosa temporal^{4,5}.

Los resultados de estudios experimentales indican que en los músculos lisos y en las células endoteliales del cuerpo cavernoso se pueden producir patrones de agresión oxidativa y cambios apoptóticos con una frecuencia y una velocidad variables después de la neuropraxia o la neurectomía⁶.

La agresión oxidativa se debe a un desequilibrio entre la formación de radicales libres en el organismo y los elementos que los eliminan, y provoca la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO) en el tejido. Se ha demostrado que las ERO, que pueden acumularse en el cuerpo cavernoso durante la agresión oxidativa, constituyen una posible causa de DE⁷. Se ha descrito que la agresión oxidativa es uno de los determinantes principales de la degradación del óxido nítrico (NO), por lo que puede constituir una explicación de la aparición de DE después del trauma quirúrgico⁸.

El ácido alfa lipoico (AAL) es un antioxidante presente en todas las células que aumenta la producción de energía y la capacidad de curación. El AAL ejerce sus propiedades antioxidantes eliminando los radicales libres y estableciendo la regeneración del ácido ascórbico y el glutatión⁹. A causa de sus propiedades antioxidantes, se ha investigado el AAL como producto terapéutico en la diabetes, el daño por isquemia-perfusión, la intoxicación por metales pesados, el

daño por radiación, la neurodegeneración y la infección por el VIH¹⁰⁻¹².

En este estudio experimental investigamos los efectos del AAL en la rehabilitación del tejido cavernoso y las fibras nerviosas que contenían sintasa del óxido nítrico (NOS) en el tejido eréctil. Utilizamos ratas Sprague Dawley como modelo animal.

Materiales y métodos

Se formaron cuatro grupos en este estudio incluyendo 63 ratas Sprague Dawley fértiles adultas (60-90 días de vida, 250-300 g): grupo de control (n: 9), grupo de operación simulada (n: 18), grupo de sección unilateral del nervio cavernoso (grupo DI; n: 18) y grupo tratado con AAL tras sección unilateral del nervio cavernoso (grupo DII; n: 18).

Procedimiento quirúrgico: se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (35 mg/kg) por vía intraperitoneal. Mediante una incisión inferior en la línea media abdominal se exploró la zona posterolateral a la próstata en un lado y se identificaron y expusieron el plexo pélvico, el nervio pélvico y el nervio cavernoso. Las intervenciones se realizaron con un asa de operación (Heine, Alemania, 4.5X). En el grupo simulado se identificó el nervio cavernoso, pero no se cortó. En el grupo de neurotomía se practicó una ablación unilateral del nervio cavernoso extirpando un segmento de 5 mm como se ha descrito con anterioridad (Kienecker, 1990)²³. La herida se cerró en dos capas con sutura continua de 3-0 monofilament dexton (Covidien Synture) absorbible. Los animales del grupo control no se sometieron a ningún procedimiento quirúrgico, excepto la recogida de tejido cavernoso. Las ratas del grupo de sección unilateral del nervio cavernoso (DII) recibieron 65 mg/kg de AAL por vía intraperitoneal empezando el primer día después de la operación.

Evaluación funcional y obtención de tejido

Tres semanas después de la intervención se hizo una exploración de las ratas de cada grupo, excepto las del grupo control, para electroestimulación directa de los nervios cavernosos contralaterales antes de recoger el tejido. Tras exponer los órganos de la pelvis y el nervio cavernoso se hizo una incisión en la piel del pene y se extirpó en parte el músculo isquiocavernoso para exponer las raíces del pene. Se introdujo una aguja con aletas de calibre 23 en la raíz derecha para medir la presión intracavernosa (PIC). La electroestimulación se realizó con un pequeño electrodo de gancho bipolar de acero inoxidable. Cada polo tenía 0,1 mm de diámetro y los dos polos estaban separados por ~1 mm. Un amplificador de corriente constante personalizado generó la electroestimulación. Los parámetros del estímulo fueron 1,5 mA, 20 Hz de frecuencia, 0,2 ms de amplitud del pulso y 1 min de duración. La PIC se midió mediante un transductor de presión BD DTX Plus (Becton, Dickinson and Company) y se registró mediante el registrador de presión Cavomat 7000 (Weist Medizintechnik GmbH, Munich, Alemania). Después de una evaluación funcional se extirpó un segmento de la parte central del cuerpo del pene y se dividió transversalmente en dos fragmentos. Una parte se puso en fijador y la otra se incluyó

en nitrógeno líquido inmediatamente. La obtención de tejido en el grupo control se llevó a cabo como se ha descrito, sin electroestimulación.

Tinción del fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina diaforasa: las muestras de tejido se fijaron en una solución fría recién preparada de formaldehído al 2% y ácido pícrico al 0,002% en tampón de fosfato sódico 0,1 M, a pH 8,0. A continuación, se incluyó en compuesto OCT, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C. El tejido se cortó con un grosor de 7 micras con crióstato y se adhirió a portaobjetos cargados, se secó al aire durante 5 min y se hidrató durante 10 min con tampón de fosfato sódico 0,1 M, a pH 8,0. Se incubaron los cortes con fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) 0,1 mM, nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma-Aldrich) 0,2 mM y Triton X-100 (Mallinckrodt Chemical) al 0,2% en tampón de fosfato sódico 0,1 M (Sigma-Aldrich) a pH 8,0 durante 60 min a temperatura ambiente. El lavado de los cortes en el tampón terminó la reacción; a continuación, se pusieron los cubreobjetos con glicerina tamponada como medio de preparación. La presencia de estructuras positivas para NADPH-diaforasa se determinó como regiones azules densas en la tinción. El patrón de tinción se evaluó contando el número de regiones positivas para NADPH-diaforasa en cada cuerpo cavernoso en dos zonas arbitrarias (ampliación de 400×). La tinción del endotelio no se incluyó en el recuento.

Homogenización del tejido: las muestras de tejidos se pesaron (peso húmedo) y se homogeneizaron en NaCl al 0,9% helado para producir un homogeneizado 1/10 (p/v). La homogenización del tejido se efectuó con un triturador de tejido equipado con una mano de teflón. El homogeneizado se sometió a ultrasonidos con Sonicator MSE Soniprep 150 (Wolf Laboratories Limited, Reino Unido) dos veces con intervalos de 30 segundos en hielo, con una potencia de salida de 38 W. Los homogeneizados expuestos a ultrasonidos se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min para medir la peroxidación lipídica (Lpx) y a 15.000 rpm durante 15 min para medir la actividad de superóxido dismutasa (SOD), a 4 °C. Se realizaron análisis bioquímicos con los sobrenadantes.

Medición de la peroxidación lipídica: se determinaron las concentraciones de sustancias que reaccionaban con el ácido tiobarbitúrico en el tejido (TBARS, por su sigla en inglés) como un marcador de la Lpx con el método espectrofotométrico descrito por Buege y Aust. La solución original estaba compuesta por ácido tricloroacético al 15%, ácido tiobarbitúrico al 0,375% y ácido clorhídrico 0,25 N. Las muestras se calentaron al baño María durante 20 min y, después de enfriarse, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 15 min. La formación de un color rosa como resultado de la reacción entre una molécula de TBARS y dos moléculas de ácido tiobarbitúrico se midió a 560 nm mediante espectrofotometría.

Medición de la actividad de la superóxido dismutasa en el tejido: la actividad de la SOD en el tejido se midió mediante el método modificado de Sun. Este análisis para la actividad de la SOD (SOD, EC 1.15.1.1) consiste en inhibición de la reducción del NBT, y se utiliza xantina-xantina oxidasa como generador de superóxido. Una unidad de SOD se define como la cantidad de proteína que inhibe la velocidad de reducción del NBT en un 50%. La mezcla de la reacción consistió en 40 ml de 0,3 mmol/l de solución de xantina, 20 ml de 0,6 mmol/de

solución de EDTA, 20 ml de 150 μ mol/l de solución de NBT, 12 ml de 400 mmol/l de solución de Na_2CO_3 y 6 ml de seroalbúmina bovina. La concentración final de xantina

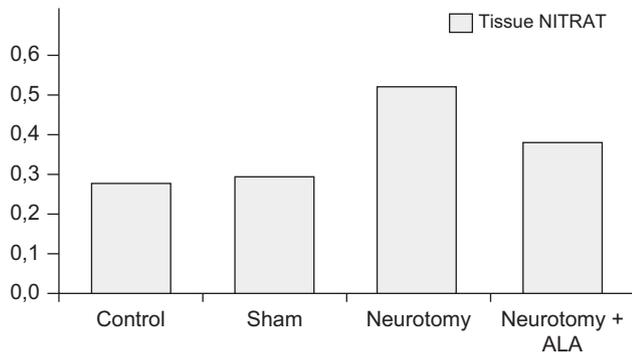


Figura 1 - Concentraciones de nitrito+nitrato en el tejido (μ mol/g de tejido húmedo).

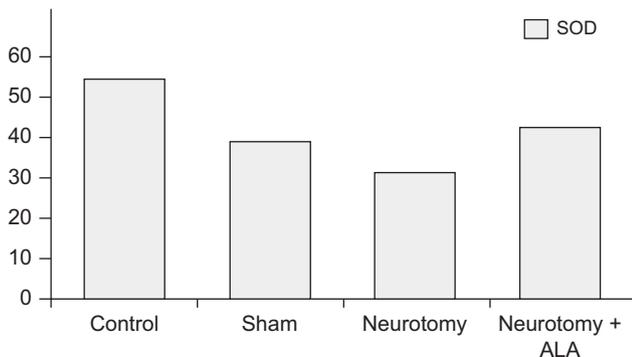


Figura 2 - Actividad de la superóxido dismutasa en el tejido (U/g de tejido húmedo).

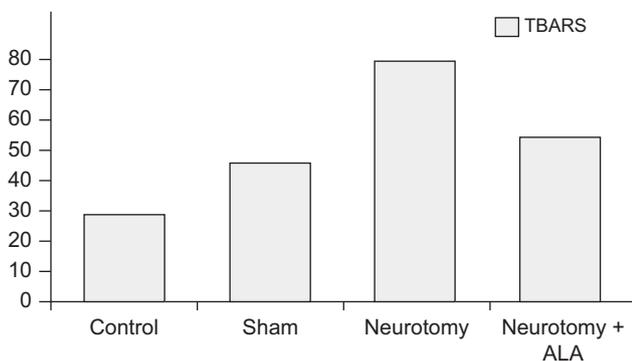


Figura 3 - Concentraciones de ácido tiobarbitúrico en el tejido (nmol/g de tejido húmedo).

oxidada fue entonces de 167 U/l. La producción de formazón se determinó mediante espectrofotometría a 560 nm.

Medición de las concentraciones totales de nitrito+nitrato: como marcador del NO, se determinaron las concentraciones totales de nitrito+nitrato mediante un análisis colorimétrico (Boehringer-Mannheim, Alemania). El principio del análisis depende de la medición del nitrito con la reacción de Griess, en la cual el nitrato presente en la muestra se reduce primero a nitrato reductasa de manera enzimática.

Análisis estadístico: los resultados se compararon con un ANOVA unilateral. Se empleó la prueba HSD de Tukey post hoc para comparaciones múltiples. Los valores se consideraron significativos con $p < 0,05$. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (figs. 1-3).

Resultados

La PIC máxima generada después de la estimulación del nervio cavernoso en el grupo simulado, en el grupo de neurotomía unilateral y en el grupo de neurotomía unilateral tratado con AAL fue de 80,55 \pm 9,82, 33,8 \pm 16,9 y 64,2 \pm 11,8 cm/H₂O, respectivamente (tabla 1).

El examen histológico de las muestras de la mitad del cuerpo del pene reveló una pauta de tinción distinta en el cuerpo cavernoso de los grupos. El número de fibras nerviosas con NOS por cuerpo cavernoso disminuyó significativamente en ambos grupos de neurotomía (grupos DI y DII) en comparación con los grupos de control y simulado (tabla 2). La tinción para NADPH-diaforasa del grupo de neurotomía DII se recuperó significativamente en comparación con el grupo de neurotomía DI (56,3 \pm 12,8 y 17,22 \pm 6,67, respectivamente) ($p < 0,05$) (fig. 4). No hubo diferencias entre la tinción del grupo simulado (98 \pm 14) y el grupo de control (105,6 \pm 14,2) ($p > 0,05$).

El grado de Lpx del cuerpo cavernoso se determinó midiendo las concentraciones de TBARS. Se comprobó que la concentración tisular de TBARS era significativamente menor en el grupo de control (28,64 \pm 3,97 nmol/g de tejido húmedo) que en el resto de los grupos ($p < 0,05$ frente a todos; tabla 3). El resultado del grupo de neurotomía DI (79,11 \pm 8,42 nmol/g de tejido húmedo) fue significativamente mayor que el de los otros grupos ($p < 0,05$ frente a todos). La concentración de TBARS del grupo DII (54,13 \pm 5,72) fue mayor que la del grupo simulado (46,37 \pm 3,09 nmol/g de tejido húmedo) ($p < 0,05$).

La actividad de la SOD en el grupo de control (54,56 \pm 1,15 U/g de tejido húmedo) fue significativamente mayor que en los demás grupos ($p < 0,05$) (tabla 3). Dicha actividad disminuyó en los grupos DI y DII (31,42 \pm 6,06 y 42,51 \pm 3,62 U/g de tejido húmedo).

Tabla 1 - Presión intracavernosa

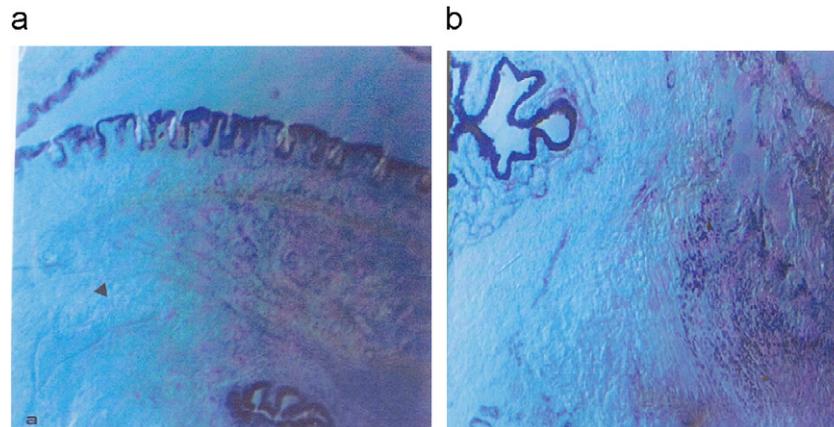
	Simulado	Neurotomía	Neurotomía+AAL
Presión intracavernosa (cmH ₂ O)	80,55 \pm 9,82	33,8 \pm 16,9	64,2 \pm 11,8

AAL: ácido alfalipoico.

Tabla 2 – Zonas teñidas para fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina diaforasa (fibras nerviosas teñidas en dos tejidos cavernosos con ampliación 400 ×)

	Control	Simulado	Neurotomía	Neurotomía+AAL
Número de fibras con NADPH(+)	105,6±14,2	92,3±9,7	17,3±6,7	56,3±12,8

AAL: ácido alfalipoico; NADPH: fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina.

**Figura 4 – Ablación unilateral del nervio cavernoso: a) tinción para fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina diaforasa a las 3 semanas (ampliación 240 ×); b) se administró ácido alfalipoico después de la neurotomía, indicando regeneración de nervios que contenían sintasa del óxido nítrico (▲) (ampliación 360 ×).****Tabla 3 – Resultados bioquímicos en los 3 grupos**

	Control	Simulado	Neurotomía	Neurotomía+AAL	p
Nitrato en el tejido (μmol/g de tejido húmedo)	0,27±0,02	0,29±0,06	0,52±0,05	0,38±0,03	<0,05
SOD en el tejido (U/g de tejido húmedo)	54,68±1,15	39,25±2,99	31,42±6,06	42,51±3,62	<0,05
TBARS en el tejido (nmol/g de tejido húmedo)	28,64±3,97	46,37±3,09	79,11±8,42	54,13±5,72	<0,05

AAL: ácido alfalipoico; SOD: superóxido dismutasa; TBARS: ácido tiobarbitúrico en el tejido.

En la tabla 3 se muestran las concentraciones totales de nitrato+nitrato. Dichas concentraciones aumentaron significativamente en los grupos DI y DII (0,52±0,05 y 0,38±0,03 μmol/g de tejido húmedo, respectivamente) en comparación con los otros grupos ($p < 0,05$). No hubo diferencias estadísticas entre los resultados del grupo de neurotomía DI y el grupo DII ($p > 0,05$). Las concentraciones tisulares de nitrato+nitrato de los grupos de control (0,27±0,02 μmol/g de tejido húmedo) y simulado (0,29±0,06 μmol/g de tejido húmedo) no difirieron significativamente entre sí ($p > 0,05$).

Discusión

En las intervenciones quirúrgicas de preservación de los nervios que se realizan en las prostatectomías radicales para mantener la función eréctil en el tratamiento del cáncer se conservan los nervios con precisión. Sin embargo, a pesar de la preservación de los nervios no se puede mantener siempre

la capacidad eréctil. Este hecho no se comprende con claridad. Los resultados de estudios experimentales indican que pueden aparecer algunos patrones de agresión oxidativa con frecuencia y velocidad diferentes y cambios apoptóticos en los músculos lisos y en las células endoteliales del cuerpo cavernoso². En estudios experimentales, la apoptosis y la agresión oxidativa pueden alcanzar el máximo nivel a los 2-7 días de la sección transversal del nervio cavernoso³. Datos de estudios científicos básicos señalan que la agresión oxidativa mediada a través del radical superóxido (superóxido) y otras ERO puede ser esencial en la alteración de la función cavernosa en la DE¹³. Como la DE en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina se ha atribuido a radicales libres resultantes de la agresión oxidativa, planteamos la hipótesis de que dicha agresión podría ser una posible causa de la DE después del trauma quirúrgico. En su calidad de potente antioxidante, el AAL puede resultar eficaz para corregir la funcionalidad evitando la agresión oxidativa.

El AAL es un potente antioxidante natural que está presente en todas las células y aumenta la producción de energía y la

capacidad de curación. Para ser un posible antioxidante, todo compuesto debe tener algunas propiedades químicas y bioquímicas. Tales propiedades son la especificidad de eliminación de radicales libres, la actividad de quelación de metales, la interacción con otros antioxidantes y la absorción y concentración en líquidos intracelulares y extracelulares. El antioxidante ideal debe tener todas estas características. La pareja ácido alfalipoico/ácido dihidrolipoico está muy próxima al ideal y se denomina «antioxidante universal». El ácido alfalipoico/ácido dihidrolipoico tiene capacidad de regeneración contra otros radicales de antioxidantes y formas inactivas. Dadas estas características antioxidantes, se ha investigado un medicamento en trastornos como la diabetes, el daño por isquemia-perfusión, la intoxicación por metales pesados, el daño por radiación, la neurodegeneración y la infección por el VIH^{10-12,14}.

En ambos grupos de neurotomía de nuestro estudio las fibras nerviosas con NOS disminuyeron considerablemente en el tejido cavernoso en comparación con los grupos de control y simulado (tabla 2). El aumento de las fibras nerviosas con NOS en el grupo DII fue significativo en comparación con el grupo DI ($17,22 \pm 6,67$ y $56,13 \pm 12,8$, respectivamente) ($p < 0,05$). Se sabe que los nervios autónomos se regeneran después de una lesión, si bien en grados variables¹⁵. Hay diferentes informes de modelos animales después de neurotomía cavernosa unilateral para regeneración de los nervios. Por primera vez, Carrier et al notificaron que el número de fibras nerviosas con NOS en el cuerpo cavernoso disminuía a un mínimo en el lado de la neurotomía a las 3 semanas, mientras que a los 6 meses se observó una regeneración significativa¹⁶. En otro estudio se investigó el efecto de la neurotomía cavernosa unilateral y bilateral en un modelo de rata¹⁷. Basar et al comunicaron que en el grupo de neurotomía unilateral la actividad de la NOS y la tinción para la NADPH-diaforasa aumentaron obviamente en los sinusoides a los 3 meses, en comparación con la neurotomía bilateral e incluso con el grupo control. Estos autores concluyeron que la desnervación cavernosa unilateral aumenta la actividad de la NOS. Es difícil de entender la hiperexpresión de la tinción para la NADPH-diaforasa en el tejido cavernoso después de la neurotomía unilateral, donde cabe esperar DE. La explicación de los autores para la posible DE después de la desnervación cavernosa fue la alteración de la acción farmacológica del NO. Al contrario de nuestro estudio, las fibras con NOS en el cuerpo cavernoso disminuyeron en el grupo de neurotomía DI en comparación con los grupos control y simulado. En nuestro estudio, en las ratas que formaban el grupo DII, tratado con AAL después de la neurotomía, la positividad de la tinción de la NADPH-diaforasa aumentó en el cuerpo cavernoso. Se supone que el incremento de las fibras con tinción de NADPH-diaforasa positiva en el cuerpo cavernoso durante la inyección de AAL después de la neurotomía constituye una regeneración de las fibras neuronales. Carrier et al habían demostrado anteriormente este fenómeno al verificar que a los 6 meses se producía un aumento de las fibras positivas para NOS en el cuerpo cavernoso, lo que representa un indicador de la regeneración del nervio cavernoso. La explicación razonable de la regeneración de las fibras positivas para NOS en el cuerpo cavernoso de la rata, expresada como un aumento del número de fibras con tinción positiva de NADPH-diaforasa, es el brote de nervios intactos a partir del cuerpo cavernoso contralateral. En

otro estudio, Jung et al demostraron que un tratamiento con hormona del crecimiento durante 21 días después de la neurotomía unilateral puede potenciar la regeneración de los nervios del pene¹⁸. Con hormona del crecimiento estos autores redujeron el periodo de regeneración a la mitad. La respuesta de la presión máxima intracavernosa a la electroestimulación mejoró en el grupo tratado con hormona del crecimiento en comparación con el grupo tratado sólo con el tampón.

Nuestro estudio concuerda con otros ensayos. Al evaluar la sección unilateral del nervio cavernoso (grupos DI y DII) observamos una disminución significativa del número de fibrillas nerviosas positivas para NOS en ambos cuerpos cavernosos en comparación con el número en el grupo simulado ($p < 0,05$) (tabla 1). Hubo una diferencia significativa en la tinción entre los dos grupos, el grupo de neurotomía unilateral y el grupo tratado con AAL, después del mismo procedimiento en cuanto a alivio de la agresión oxidativa y aumento de la regeneración. Se detectó un incremento estadísticamente significativo en el número de fibrillas nerviosas positivas para NOS ($p \leq 0,05$). Esto demuestra que el AAL favorece significativamente la regeneración nerviosa en el tejido cavernoso tras la desnervación y la rehabilitación del pene.

En nuestro estudio las evaluaciones funcionales confirmaron que los grupos de neurotomía (DI y DII) tuvieron una PIC significativamente menor que ambos grupos simulados ($p < 0,05$) (tabla 1). La estimulación del nervio cavernoso intacto en el lado contralateral reveló una PIC mejor en el grupo DII que en el grupo DI ($64,2 \pm 11,8$ y $33,89 \pm 16,91$ cmH₂O, respectivamente) ($p < 0,05$). Aunque la PIC se recuperó en el grupo DII en comparación con el grupo DI ($p < 0,05$), la recuperación fue menor que en los grupos simulados ($80,55 \pm 9,82$). Estos resultados demuestran que la mejoría de la PIC después de la neurotomía unilateral no es satisfactoria para una recuperación completa de la función eréctil. Esta observación concuerda con la consecuencia clínica de la aparición de DE tras la cirugía de próstata con preservación unilateral del nervio. Los estudios clínicos indican que la función eréctil mejora después de la operación, pero se sigue observando DE en el 30-60% de los pacientes 18 meses después de la prostatectomía con preservación unilateral del nervio².

La agresión oxidativa por trauma quirúrgico en el cuerpo favorece la acumulación de ERO en el tejido, que son radicales libres⁶. Las ERO bien conocidas son el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. También se puede aceptar al NO como radical libre. En una situación patológica, la producción excesiva de NO provoca que esta molécula se comporte como un radical de nitrógeno reactivo en el tejido⁸. Las bajas concentraciones de ERO son beneficiosas e incluso indispensables en procesos como la señalización intracelular y la defensa contra los microorganismos. No obstante, se ha señalado que las ERO son un mediador patológico importante en muchos trastornos clínicos. Si las ERO no se neutralizan con eficacia con un sistema de defensa antioxidante en los tejidos o si se producen ERO en exceso sobreviene un daño funcional en el tejido e incluso puede ocurrir la muerte celular¹⁷.

Datos de estudios científicos indican que la agresión oxidativa tiene un efecto perjudicial en la función eréctil¹⁹.

La posible patogenia de la agresión oxidativa en la función eréctil consiste en el aumento de la inactivación del NO por radicales libres, lo que se traduce en alteración de la transmisión del NO en el pene y relajación del músculo liso¹³. En la condición de la agresión oxidativa, Rajasekaran et al demostraron que la forma de radical del NO, el radical de nitrógeno reactivo, tenía una citotoxicidad significativa en células musculares lisas de cuerpo cavernoso humano en cultivo²⁰. Otra posible patogenia de la agresión oxidativa en relación con la DE es la producción de angiopatía y alteración funcional y estructural del músculo liso y el endotelio de los cuerpos cavernosos, con la consiguiente DE⁷. Para investigar si el trauma quirúrgico (operación simulada) y la neurotomía unilateral podían causar agresión oxidativa en el cuerpo cavernoso empleamos el método de TBARS como índice de la agresión oxidativa y comparamos los resultados con un grupo control. También medimos la actividad de la SOD, que como bien se sabe está implicada en el sistema de depuración del tejido, protegiéndole contra los radicales libres. La actividad de la SOD disminuye con el inicio de la agresión oxidativa en los tejidos, a causa del uso excesivo por radicales libres. La concentración de nitrito+nitrato en el tejido cavernoso se midió mediante análisis colorimétrico. La biotransformación del NO y de sus N-óxidos relacionados tiene lugar a través de distintas vías metabólicas en el organismo. Los principales metabolitos del NO son el nitrito y el nitrato.

En nuestro experimento se utilizó el método de TBARS como indicador de Lpx, que es un marcador de la agresión oxidativa. La prueba de TBARS es una de las más antiguas y más utilizadas para medir la peroxidación de los ácidos grasos en las membranas celulares²¹. Cuando comparamos las concentraciones de TBARS de los grupos simulados, operados (grupos DI, DII) y de control, se observaron aumentos significativos en los grupos simulado y operado (DI, DII) con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Comprobamos que la concentración de TBARS era significativamente mayor en el grupo de neurotomía (DI, DII) que en los grupos simulado y de control emparejados por el tiempo (tabla 3). La comparación de los resultados de los grupos DI y DII demostró que la concentración de TBARS había disminuido en el grupo DII ($p < 0,05$). El motivo de esta variación en dicho grupo es el potente efecto del AAL que suprime los radicales libres de oxígeno. Estos resultados indican que el trauma quirúrgico causó agresión oxidativa en los grupos simulado y operado en comparación con el grupo control. El procedimiento de neurotomía ocasionó una agresión oxidativa más intensa que la operación simulada. Pensamos que el motivo del aumento pronunciado de la concentración de TBARS en el grupo de neurotomía fue el importante trauma de este procedimiento, y el AAL tiene un efecto protector importante frente a la agresión oxidativa que se manifiesta después de la neurotomía. Con anterioridad se había examinado la implicación de la agresión oxidativa en la patogenia de la impotencia. Los estudios de la agresión oxidativa se centran principalmente en el efecto de las ERO en animales diabéticos con DE. Que nosotros sepamos, esta es la primera vez que un estudio demuestra que el trauma quirúrgico puede inducir agresión oxidativa en el tejido cavernoso y que la agresión oxidativa puede ser también un factor causal de DE después del trauma quirúrgico pélvico.

La actividad de la SOD, que es también otro indicador indirecto de la agresión oxidativa, disminuyó significativamente en todas las ratas operadas en comparación con las del grupo control (tabla 3) ($p < 0,05$). La actividad de la SOD con la operación simulada fue de $39,25 \pm 2,54$ en comparación con $54,56 \pm 1,15$ U/g de tejido húmedo en el control. Cuando comparamos la actividad de la SOD de los grupos DI y DII ($31,42 \pm 6,06$ y $42,51 \pm 3,62$ U/g de tejido húmedo, respectivamente) se observó un incremento en el grupo DI (resolución de la agresión oxidativa). Este hecho también respalda la idea de la reducción de los efectos de la agresión oxidativa por el AAL en el tejido cavernoso después de la intervención quirúrgica. La alteración de la actividad de la SOD en todos los grupos excepto el de control demuestra que el procedimiento quirúrgico produjo agresión oxidativa en el cuerpo cavernoso y, por tanto, la actividad de la SOD disminuyó en el cuerpo cavernoso en todos los animales manipulados quirúrgicamente.

El NO es un gas incoloro químicamente inestable y poco soluble en agua. Su semivida es demasiado breve (3-4 segundos). Esta semivida se puede retrasar utilizando nitroisotiol y nitrosoproteínas durante varias horas. En medios con agresión oxidativa se puede neutralizar el NO mediante ion superóxido, con transformación en nitrito y nitratos en 10 segundos. En nuestro estudio, las concentraciones totales de nitrito+nitrato fueron significativamente mayores en ambos grupos de neurotomía (DI y DII) que en los grupos de operación simulada y de control (tabla 3) ($p < 0,05$). En el grupo DII, la concentración de nitrito+nitrato disminuyó significativamente en comparación con el grupo DI ($0,44 \pm 0,02$ y $0,52 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo, respectivamente). Este hecho también respalda la idea de la reducción de los efectos de la agresión oxidativa por el AAL en el tejido cavernoso después de la intervención quirúrgica. Sin embargo, el resultado del grupo DII siguió siendo significativamente mayor que el del grupo de control ($0,27 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo) ($p < 0,05$). La operación simulada no tuvo un efecto significativo.

En un estudio anterior, Jung et al confirmaron que la neurotomía activaba la forma endotelial de NOS (e-NOS) en el cuerpo cavernoso de la rata. La concentración de nitrito+nitrato aumentó a las 3 semanas y a los 6 meses en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). El NO y sus metabolitos son la fuente principal de nitrito+nitrato en el tejido. La concentración de nitrito+nitrato debe disminuir después de la neurotomía porque las fibras con n-NOS disminuyen a causa de este procedimiento; en cambio, en nuestro estudio, la concentración de nitrito+nitrato se elevó sólo en los grupos de neurotomía (DI y DII). Sabemos que hay otras formas de NOS para la producción de NO en el cuerpo cavernoso, a saber, la e-NOS y la forma inducible de NOS, que se han observado en cultivo de células musculares lisas de tejido cavernoso humano^{11,14}. En nuestro estudio se estimuló la e-NOS después de la neurotomía y esto produjo NO y elevación de la concentración de nitrito+nitrato en el cuerpo cavernoso. Además, la concentración de nitrito+nitrato fue mayor en el grupo de neurotomía (DI) que en el grupo tratado con AAL (DII) después de la neurotomía. La hiperexpresión de NOS en el cuerpo cavernoso (especialmente en el grupo DI) aumenta el NO y su forma de radical libre, el radical de nitrógeno reactivo⁸. El trauma quirúrgico (operación simulada) provocó agresión oxidativa, pero no aumentó la actividad

de la NOS, y no hubo una producción excesiva de NO ni una elevación de la concentración de nitrito+nitrato.

Los resultados bioquímicos de nuestro estudio revelan que los procedimientos quirúrgicos (operación simulada y neurotomía unilateral) produjeron agresión oxidativa en el cuerpo cavernoso (aumento de TBARS y disminución de la actividad de la SOD); en el grupo de neurotomía observamos una mayor concentración de nitrito+nitrato, probablemente por la hiperexpresión de e-NOS. Asimismo, concluimos que el AAL tiene un efecto significativo en los patrones de agresión oxidativa, lo que sucede en el tejido cavernoso después de la intervención quirúrgica, que causa insuficiencia cavernosa. La operación simulada, que se podría equiparar a la prostatectomía con preservación de los nervios bilateral como implantación clínica, produjo agresión oxidativa en el cuerpo cavernoso, lo que explicaría la DE después de la prostatectomía con preservación de los nervios bilateral. En un estudio de Khan et al se demostró que en conejos diabéticos las ERO intervienen de forma importante en el desarrollo de la DE como consecuencia de la alteración de la relajación del músculo liso, alteración que la SOD corrigió significativamente²².

Conclusión

Este estudio confirma que la neurotomía disminuyó la PIC y las fibras con NOS, y que la neurotomía y el trauma quirúrgico produjeron agresión oxidativa en el cuerpo cavernoso de las ratas. La agresión oxidativa que sobrevino después de la operación simulada y la neurotomía unilateral fue más intensa en el grupo de neurotomía. En su calidad de potente antioxidante, el AAL tiene efectos positivos en la regeneración y rehabilitación del tejido cavernoso al disminuir la agresión oxidativa. En este sentido, en el tratamiento de la DE que aparece después de la prostatectomía radical, como complemento de la rehabilitación del pene, el AAL puede ser beneficioso en monoterapia o en combinación con otros medicamentos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: Insight into etiology and prevention. *J Urol.* 1982;128:492-6.
- Walsh PC, Epstein JI, Lowe FC. Potency following radical prostatectomy with wide unilateral excision of the neurovascular bundle. *J Urol.* 1987;138:823.
- Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: Results at 10 years. *J Urol.* 1994;152:1831.
- Kreinhoff U, Elmadfa I, Salomon F, Weidler B. Antioxidant status after surgical stress. *Infusionstherapie.* 1990;17:261-7.
- Mirone V, Imbimbo C, Palmieri A, Longo N, Fusco F. Erectile dysfunction after surgical treatment. *Int J Androl.* 2003;26:137-40.
- Burnett AL, Lowenstein CJ. A physiologic mediator of penile erection. *Science.* 1992;257:401-3.
- Carrier S, Hricak H, Lee S. Radiation induced decreases in nitric oxide synthase-containing nerve in the rat penis. *Thera Radio.* 1995;195:95.
- Hope BT, Michael GJ, Knighe KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Neurobiology.* 1991;88:2811.
- Packer L, Witt EH, Tritshler HJ. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995;19:227-50.
- Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspect of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition.* 2001;17:888-95.
- Liang JF, Akaike T. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured Mouse hepatocytes by α -lipoic acid. *Chem Biol Interact.* 2000;124:53-60.
- Cakatay U. Pro-oxidant action of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses.* 2006;66:110-7.
- Chen LE, Seaber AV, Glisson RR, Davies H, Murrell GA, Anthony DC, et al. The functional recovery of peripheral nerves following defined acute crush injuries. *J Orthop Res.* 1992;10:657-64.
- Goralska M, Dackar R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in less epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2003;76:241-8.
- Gibson GR. Impotence following fractured pelvis and ruptured urethra. *Br J Urol.* 1970;42:86-9.
- Carrier S, Zvara P, Nunes L, Kour NW, Reh-man J, Lue TF. Regeneration of nitric oxide synthase-containing nerves after cavernous nerve neurotomy in the rat. *J Urol.* 1995;156:1722-7.
- Basar M, Yildiz M, Söylemezoglu F. Histopathological changes and nitric oxide synthase activity in corpus cavernosum from rats with neurogenic erectile dysfunction. *Br J Urol Int.* 1999;83:101-7.
- Jung GW, Spencer M. Growth hormone enhances regeneration of nitric oxide synthase-containing penile nerves after cavernous nerve neurotomy in rats. *J Urol.* 1998;160:1899-904.
- Jones RW, Rees RW, Minhas S, Ralph D, Persad RA, Jeremy JY. Oxygen free radicals and the penis. *Expert Opin Pharmacother.* 2002;3:889-97.
- Rajasekaran M, Mondal D, Agrawal K, Chen IL, Hellstrom W, Sikka S. Ex vivo expression of nitric oxide synthase isoforms (eNOS/iNOS) and calmodulin in human penile cavernosal cells. *J Urol.* 1998;160:2210-5.
- Gutteridge JMC, Quilan GJ. MDA formation from lipid peroxides in the TBA test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J Appl Biochem.* 1983;5:293-9.
- Khan MA, Thompson CS, Jeremy JY, Mumtaz FH, Mikhailidis P, Morgan RJ. The effect of superoxide dismutase on nitric oxide-mediated and electrical field-stimulated diabetic rabbit cavernosal smooth muscle relaxation. *BJU Int.* 2001;87:98-103.
- Kienecker EW, Becker KW, Dick P. Modification of degenerative and regenerative processes in peripheral nerves by treatment with B vitamins. *Klin Wochenschr.* 1990;68:146-8.