

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

9

**ANÁLISIS DEL EFECTO PROTECTOR DE LA
PROGESTERONA CONTRA EL DAÑO PROVOCADO
POR ISQUEMIA-ANOXIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA
EN EL GATO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. en C. F. MARÍA DOLORES GONZÁLEZ VIDAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO

México, D.F.

2000

27976



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI FAMILIA:

✿ *GABRIEL DEL CAMPO AGUILAR,*

✿ *MAVY GEORGINA DEL CAMPO GONZÁLEZ*

✿ *JOSÉ GABRIEL DEL CAMPO GONZÁLEZ*

✿ *JESÚS GONZÁLEZ NAVARRETE*

✿ *DOLORES VIDAL DE GONZÁLEZ*

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por darme la oportunidad de realizar este posgrado.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por el apoyo económico otorgado para la obtención del equipo y material utilizado en la ejecución del trabajo experimental. Proyecto No. 3400P-M9608.

A LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL por las facilidades brindadas para la elaboración del trabajo experimental.

AL DR. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO por su valiosa guía y ayuda en la realización de esta tesis.

A LA DRA. GABRIELA MORALI por sus valiosos consejos tanto en la fase experimental como en la elaboración de esta tesis.

AL Sr. RODRIGO RUELAS, técnico en el manejo de aparatos electrodiagnósticos por su apoyo en la realización del trabajo experimental.

AL DR. ALFONSO ESCOBAR IZQUIERDO por su apoyo durante los años en que lleve a cabo esta tesis.

AL HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA DEL CMN S. XXI y al DR. RUBEN ARGÜERO SÁNCHEZ por haber permitido nuestra estancia en el hospital, así como al DR. ARMANDO MANSILLA OLIVARES por su apoyo.

AL DR. SERGIO ROSAS jefe del bioterio del IMSS por la aportación de las gatas utilizadas en este estudio y el apoyo técnico en el manejo de los animales.

A LOS ESTUDIANTES DE PREGRADO por la ayuda prestada en el trabajo experimental.

ÍNDICE

RESUMEN	4
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	8
Fenómenos fisiopatológicos provocados por la isquemia	8
Alteraciones celulares	13
Protección neuronal farmacológica	22
Agonistas GABAérgicos	25
Neurotransmisor inhibitorio GABA	26
Esteroides y Sistema Nervioso Central	28
Actividad eléctrica cerebral e isquemia	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	38
Paro cardiorrespiratorio	42
Seguimiento y estudio histológico	44
Análisis estadístico	47
CONSIDERACIONES ÉTICAS	48
RESULTADOS	49
Análisis de la actividad eléctrica cerebral	51
Electroencefalograma	51
Actividad multineuronal	53
Deficiencia neurológica	55
Análisis de la población neuronal del hipocampo	56
Análisis de la población neuronal de la sustancia nigra pars reticulata	58
DISCUSIÓN	60
Conclusiones	69
APÉNDICE	
Hipocampo	70
Sustancia nigra	81
REFERENCIAS	85

RESUMEN

La isquemia cerebral global produce daño cerebral que puede ser incompatible con la vida o provocar secuelas neurológicas de naturaleza y magnitud variable.

Los fenómenos fisiopatológicos provocados por un período de isquemia cerebral dependen principalmente de la duración del período de isquemia, de la vulnerabilidad de los diferentes tipos neuronales en las diferentes regiones cerebrales, así como de la aplicación oportuna de procedimientos terapéuticos que eviten el daño neuronal.

Entre las neuronas más vulnerables a la isquemia cerebral se encuentran las neuronas piramidales de los campos CA en el hipocampo (HIP), las neuronas de la pars reticulata en la sustancia nigra (SNr), las del tálamo y en la corteza cerebral las capas 3, 5 y 6. El daño neuronal inducido por la isquemia en el HIP y la SNr, puede resultar de la excitotoxicidad causada por un severo desbalance entre las entradas excitadora e inhibitoria sobre estas neuronas.

Ha sido descrito que el incremento de la neurotransmisión GABAérgica previene la pérdida de las neuronas piramidales del HIP, de las neuronas en la SNr y de las neuronas en el estriado inducida por la isquemia. De este modo los agonistas del receptor GABA_A han mostrado tener un efecto protector sobre las neuronas piramidales del hipocampo.

Algunos esteroides naturales, incluyendo a la progesterona (P₄) y a sus metabolitos neuroactivos, así como algunos esteroides sintéticos alteran la excitabilidad neuronal a través de sus efectos membranales y de un incremento de la neurotransmisión GABAérgica.

Se puede asumir que la P₄ o sus metabolitos neuroactivos, pueden incrementar la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria y proveer de una condición endógena capaz de prevenir o reducir algunos de los fenómenos fisiopatológicos que provocan el daño de los componentes celulares del sistema nervioso central como resultado de la isquemia-anoxia. Este efecto protector puede ser especialmente evidente en neuronas de estructuras cerebrales específicas que, aún cuando son muy vulnerables, poseen una gran inervación GABAérgica, por ejemplo las neuronas piramidales del hipocampo. La administración de P₄ días antes y después de un episodio de isquemia-anoxia puede prevenir o reducir el daño neuronal del hipocampo.

Gatas adultas fueron ovariectomizadas y tratadas con P₄ sc (10 mg/kg/día) o con aceite de maíz durante siete días antes y siete días después de un período de isquemia cerebral global aguda por paro cardiorrespiratorio (PCR) de 15 min. de duración seguido de 4 min. de maniobras de reanimación. Se investigó el efecto de la progesterona a través del análisis de los cambios en la actividad multineuronal (AMN) registrada diariamente en el HIP, en la SNr y en la formación reticular mesencefálica (FRM), en la población neuronal del HIP y de la SNr y en los puntajes de la deficiencia neurológica debida a la isquemia cerebral en gatas adultas ovariectomizadas tratadas con vehículo o con progesterona en comparación con las gatas sham tratadas con vehículo. La frecuencia de descarga de la actividad multineuronal disminuyó gradualmente bajo el tratamiento con progesterona, pero no con el tratamiento con vehículo, antes del PCR a valores del 30 al 53 % de los valores control (p<0.001) en estas estructuras cerebrales; en las siguientes 6 h después del PCR se observó una reducción hasta el 10 % (p<0.001). En los días posteriores al paro cardiorrespiratorio y aún bajo tratamiento con P₄ los valores de la AMN en todas las estructuras registradas

fueron similares a los encontrados antes del PCR y se observó un incremento de estos valores después de la suspensión del tratamiento, aunque no llegaron a los valores control en el HIP ($p < 0.001$) y en la SNr y la FRM ($p < 0.05$). Los valores en la frecuencia de disparo de la AMN en las gatas tratadas con aceite permanecieron por debajo del 13% de los valores control después del PCR ($p < 0.001$). Los puntajes de la deficiencia neurológica después del PCR fueron significativamente menores en las gatas tratadas con P₄ que en las tratadas con vehículo. Después de 14 días de sobrevivencia los animales fueron sacrificados y los cerebros perfundidos *in situ* para el estudio histológico. La isquemia cerebral global aguda provocó una reducción significativa de las neuronas piramidales del HIP (54 a 85 %) principalmente en los subcampos CA1 y CA2 de las gatas tratadas con vehículo. La P₄ redujo significativamente la pérdida neuronal en estas áreas (21 a 49 %). El análisis de la población neuronal de la SNr no mostró diferencias significativas entre los tres grupos. Nuestros resultados sugieren que la P₄ ejerce un efecto protector en contra del daño producido por la isquemia cerebral global aguda, probablemente al incrementar la neurotransmisión GABAérgica y disminuir la excitabilidad neuronal provocada por la misma.

Summary

Global cerebral ischemia leads either to severe brain damage incompatible with life, or to neurological sequelae of variable nature and magnitude.

The consequences of the various pathophysiological phenomena triggered by acute global cerebral ischemia mainly depend on the duration of the ischemic episode, on the differential vulnerability of the neuronal types in the different brain regions, as well as on the timely application of proper therapeutic procedures to avoid neuronal damage.

Pyramidal cells of CA fields in the hippocampus (HIP) are among the most vulnerable neurons to ischemia, and severe loss of them has been shown to occur after brief periods of ischemia, as a consequence of immediate, "maturational", and delayed neuronal death. Ischemic neuronal damage has also been described in Purkinje cells of the cerebellum, small and medium sized neurons of the striatum, substantia nigra pars reticulata (SNr), thalamus, and layers 3, 5 and 6 of cerebral cortex. The ischemic-induced neuronal damage in the HIP and SNr, may result from neurotoxicity caused by a severe imbalance between excitatory and inhibitory neurotransmitter inputs on neurons.

Enhancement of GABAergic neurotransmission has been shown to prevent the ischemia-induced loss of pyramidal neurons of the HIP and neurons in the SNr, and in the striatum.

Some natural steroids, including progesterone and its neuroactive metabolites, as well as some synthetic anesthetic steroids alter the neuronal excitability through membrane effects and an increase of the GABAergic neurotransmission.

On the above bases, it could be assumed that P₄, or its neuroactive metabolites, may increase the inhibitory GABAergic neurotransmission, and provide endogenous conditions capable of preventing or reducing some of the pathophysiological phenomena of ischemia-anoxia resulting in damage of the cellular components of the CNS; this protective effect may be specially evident in neurons owing to specific brain structures that, even being the most vulnerable, possess a high GABAergic innervation, i.e., the pyramidal neurons of the HIP and the neurons of the SNr. Thus, administration of P₄ both before and on the days following an ischemic-anoxic episode, may prevent or reduce the neuronal damage in these structures. This study was made to analyze the assumed protective effects of P₄ upon the neuronal population of CA fields of the HIP and SNr, after an acute global cerebral ischemia-anoxia episode provoked by cardiorespiratory arrest (CRA) in cats.

Adult ovariectomized cats were treated sc. with either P₄ (10 mg/kg/day) or corn oil during seven days before and seven days after being subjected to a period of acute global cerebral ischemia by 15 min of cardiorespiratory arrest followed by 4 min of reanimation. The effects of P₄ were investigated through the analysis of changes in multiunit activity (MUA) daily recorded from the HIP, SNr and mesencephalic reticular formation, changes in the EEG recorded in the parietal cortex, hippocampus, substantia nigra pars reticulata and mesencephalic reticular formation, neurologic deficit scores shown by the cats, and changes in the neuronal population of the HIP and the SNr, due to brain ischemia in comparison to non-ischemic, vehicle-treated cats subjected to sham procedures. Values of MUA firing rate gradually decreased under P₄ but not oil treatment before CRA to 30 to 53 % of control values in the various brain structures, they were further and suddenly reduced following CRA and remained below 10 % in

both groups subjected to ischemia; then, during P₄ treatment on the days following CRA, MUA firing rate gradually increased to values similar to those observed before CRA and almost recovered to control values after P₄ withdrawal; while values of MUA firing rates in vehicle-treated cats remained under 13 % of control values during the 14 days after CRA. Neurological deficit scores on the first 5 days after CRA were significantly lower in P₄-treated cats than in vehicle-treated ones. After fourteen days survival, animals were sacrificed and the brains perfused *in situ* and formalin-fixed for histological examination. Acute global cerebral ischemia resulted in a severe loss of neurons (54 to 85 %) mainly in CA1 and CA2 subfields of vehicle-treated cats. Progesterone significantly reduced the neuronal loss in those areas (21 to 49 %). However, the neuronal population of the SNr, did not show significant changes at this period after acute cerebral ischemia. Overall results suggest that P₄ exerts protective effects against the cerebral damage induced by acute global cerebral ischemia, probably due to increase to the GABAergic activity and to the diminution of the neurotoxicity caused by a severe imbalance between excitatory and inhibitory neurotransmission on the neurons.

INTRODUCCIÓN

La reducción del suministro de oxígeno y glucosa al sistema nervioso central (SNC) hasta valores menores a los mínimos compatibles con el funcionamiento celular, como ocurre en la isquemia cerebral global, puede dar lugar al daño irreversible de neuronas y células gliales; así como de los componentes celulares de la red vascular, ubicados en estructuras cerebrales específicas (Raichle 1983, Hossmann 1985, Kaplan y cols. 1987, Kogure y cols. 1988, Krause y cols. 1988, Haddad y Jiang 1993, Siesjö y cols. 1995).

Durante diferentes condiciones patológicas como son: el paro cardíaco, la arritmia, la hipotensión severa, los accidentes por anestésicos y el ahogamiento, se presenta una disminución o interrupción del flujo sanguíneo cerebral global y como consecuencia puede ocurrir el daño isquémico cerebral. En los Estados Unidos se han establecido medidas terapéuticas para el cuidado inicial dentro de las primeras 24 h de estos pacientes, que han ayudado a obtener una mayor sobrevivencia de los mismos; así el 64% de los pacientes sobrevive debido a la terapia básica avanzada suministrada en el hospital (Adams y cols. 1994, Beech y cols. 1996). Sin embargo, estos pacientes sobreviven con múltiples secuelas de naturaleza y magnitud diversas, que frecuentemente producen invalidez y requieren de atención médica permanente. De este modo el número de pacientes con secuelas neurológicas y psiquiátricas posteriores al cuadro de isquemia cerebral se ha incrementado (Snider y cols. 1977, Earnest y cols. 1980, Kotila y cols. 1984, Graham 1985, Adams y cols. 1994, Beech y cols. 1996).

Fenómenos fisiopatológicos provocados por la isquemia

Los fenómenos fisiopatológicos provocados por la isquemia cerebral global aguda son múltiples, interaccionan entre sí y sus consecuencias sobre la estructura y la función de los componentes del sistema nervioso dependen principalmente de la

duración de la isquemia, de la vulnerabilidad de los diferentes tipos neuronales y celulares que forman parte de las diversas regiones cerebrales; así como de la aplicación oportuna de procedimientos terapéuticos eficaces contra el daño neuronal (Nemoto 1978, Dearden 1985, Graham 1985, Hossmann 1985, Heuser y Guggenberger 1985, Kaplan y cols. 1987, Kogure y cols. 1988, Krause y cols. 1988, Kuroiwa y cols. 1990, Nakano y cols 1990, Kuroiwa y cols. 1991, Kochs y cols. 1992, Murakami y cols. 1997).

La magnitud de dichos fenómenos fisiopatológicos depende también de la duración del período de isquemia, algunos de éstos se desencadenan durante la isquemia y otros al iniciarse la recirculación, provocando finalmente daño a los diferentes componentes celulares del SNC y aún la muerte celular. Así, puede observarse muerte neuronal que ocurre en las primeras 5 horas pos-reperfusión, entre las 5 y las 24 horas luego del período de isquemia y la perfusión; así como muerte neuronal tardía entre 1 a 7 días después del episodio de isquemia junto con la permanencia de neuronas resistentes a la isquemia (Ito y cols. 1975, Pulsinelli y cols. 1982, Hossmann 1985, Suzuki y cols. 1985, Kaplan y cols. 1987, Kogure y cols. 1988, Krause y cols. 1988, Kitagawa y cols. 1990, Murakami y cols. 1997).

No todos los componentes del SNC son igualmente vulnerables a un período de isquemia; así, existen estructuras que son muy vulnerables a la isquemia como el hipocampo, el subiculum, la corteza entorrinal, el estriado, el tálamo, la amígdala, el tubérculo olfatorio, el cerebelo, la corteza cerebral, la corteza cerebral olfatoria y la sustancia nigra (Kirino y Sano 1985, Wieloch 1985). Aún más, dentro de las mismas estructuras existen tipos celulares que son más vulnerables; así en el hipocampo las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA4 (hilio de la fascia dentada) y la región subicular son más vulnerables, en el tálamo el núcleo reticular lateral, en el cerebelo las células de Purkinje, en el estriado las neuronas de tamaño mediano, en la corteza cerebral las capas 3 y 5 y en la sustancia nigra la pars reticulata. Entre las estructuras

más resistentes a un período de isquemia se encuentran el subtálamo, el hipotálamo, la formación reticular mesencefálica y la médula espinal (Kirino y Sano 1985, Wieloch 1985, Araki y cols. 1989). La vulnerabilidad de estas estructuras se ha atribuido a diversos factores que pueden provocar los fenómenos de lisis celular, como los dependientes de la toxicidad del calcio, la activación de enzimas líticas y a otros mecanismos como la inhibición de la síntesis de proteínas o la activación de genes de muerte celular programada (Nemoto 1978, Graham 1985, Kaplan y cols. 1987, Kogure y cols. 1988). Sin embargo, la idea más aceptada es que la vulnerabilidad está relacionada con la cantidad de receptores para aminoácidos excitatorios como son el glutamato y el aspartato (densa inervación excitatoria) en los circuitos neuronales, cuya activación exagerada luego de un período de isquemia da lugar al fenómeno de "excitotoxicidad". Se ha descrito la presencia de una gran cantidad de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y de quisqualato, en las áreas vulnerables y menor densidad de receptores de tipo quisqualato y tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) en las áreas menos vulnerables (Wieloch 1985). La duración del período de isquemia influye tanto en la magnitud del daño neuronal como en la vulnerabilidad, así estructuras que no se dañan con un período de 5 min. de isquemia, se dañan también cuando la duración de la isquemia se incrementa (Wieloch 1985, Kogure y cols. 1988).

Las alteraciones vasculares provocadas por la isquemia originan cambios en el flujo sanguíneo de regiones cerebrales específicas, tales como el fenómeno de no reflujo y la hipoperfusión pos-isquemia tardía, que pueden ocurrir aún cuando se hayan restaurado condiciones globales adecuadas de perfusión y oxigenación cerebrales después del episodio de isquemia. El fenómeno de no reflujo es la falta de llenado vascular después de un período de isquemia global, que resulta de la combinación del aumento de la viscosidad de la sangre, la compresión microcirculatoria por el edema perivascular de las células gliales, la formación de microvellosidades endoteliales, el

incremento en la presión intracraneal, la hipotensión arterial pos-isquemia y la coagulopatía vascular diseminada. La duración del fenómeno de no reflujo se incrementa al prolongarse el período de isquemia, en los casos de isquemia incompleta y de obstrucción al flujo venoso (Hossmann 1990, Davies y Hagen 1993). La hipoperfusión pos-isquemia tardía es un fenómeno que se presenta cuando el flujo sanguíneo cerebral disminuye por debajo del 50% de su valor pre-isquemia. Este fenómeno se presenta después de una isquemia cerebral global o focal prolongada de más de 5 min. y se ha considerado como otro factor importante que contribuye al daño pos-isquémico. Entre mayor sea el período de isquemia es más tardío el inicio de este fenómeno. Este fenómeno de hipoperfusión pos- isquémico es diferente del fenómeno de no reflujo, ya que éste último solamente se presenta después de una fase transitoria de hiperemia reactiva y en ausencia de algún disturbio pos-isquémico inmediato al período de isquemia (Hossmann, 1990). Se ha demostrado que las arteriolas piales de pequeño (<50 μ m de diámetro), mediano (50-100 μ m de diámetro) y de mayor calibre (>100 μ m de diámetro) no muestran una respuesta vasodilatadora o está disminuida a los vasodilatadores como la acetilcolina, el óxido nítrico, el nitroprusiato y a la oxotremorina (agonista muscarínico); las arteriolas de pequeño calibre son las más afectadas. Esta respuesta anormal a los vasodilatadores inmediatamente después de presentado el fenómeno de hiperemia reactiva da como resultado el fenómeno de hipoperfusión pos-isquemia tardía (Kaplan y cols. 1987, Hossmann 1990, Davies y Hagen 1993, Clavier y cols. 1994).

El consumo de glucosa se ha correlacionado directamente con la actividad de la bomba de sodio/potasio para mantener los gradientes iónicos tanto intra como extracelulares. Para este propósito existen dos procesos: el transporte activo en contra de un gradiente eletroquímico que involucra a la ATPasa de Na⁺/K⁺, la ATPasa de Ca⁺⁺; los traslocadores de Na⁺/H⁺ y de Na⁺/Ca⁺⁺ y el transporte pasivo que ocurre a

través de canales iónicos o acarreadores, de manera que la falta de energía provoca un desbalance iónico (Hansen y Lundbaek 1989).

En condiciones básicas el cerebro consume 30 ml de O₂/100g de tejido/min. En las mismas condiciones para su metabolismo energético contiene 3 μmol/g de ATP, 5 μmol/g de fosfocreatina, 3 μmol de glucosa y 2 μmol/g de glicógeno, lo que indicaría que teóricamente el cerebro puede mantener su actividad metabólica normal por cerca de 1 min. bajo condiciones de isquemia (Hansen y Lundbaek 1989).

Las neuronas dependen para su actividad de la producción continua de ATP, por tal razón al presentarse una disminución del aporte de sustrato (glucosa) y del aceptor mitocondrial (O₂) de protones (H⁺), se alteran todos los mecanismos fisiológicos que mantienen la homeostasis celular. Clínicamente, se ha visto que los pacientes que presentan un período de isquemia pierden la conciencia a los 5 seg. y se observa aplanamiento del electroencefalograma entre los 15 a 20 seg. (Hansen y Lundbaek 1989).

En condiciones experimentales se ha observado que en primates con un flujo sanguíneo cerebral menor a 10 ml/min/100g de tejido, se priva al cerebro del sustrato y del aceptor mitocondrial de protones necesarios para el metabolismo oxidativo normal. El agotamiento de los fosfatos de alta energía (Wagner y Lanier 1994) que ocurre a los pocos segundos posteriores a la isquemia, es el factor determinante del daño neuronal. Este daño neuronal ocurre aún cuando el flujo sanguíneo cerebral y el suministro de energía se ha restaurado después del período de isquemia. De modo que la falla de energía no es la causa inmediata de la muerte celular, pero sí es el fenómeno que inicia los mecanismos que conducen al daño neuronal irreversible y que una vez iniciados, continúan su desarrollo hasta culminar con la muerte neuronal (Pulsinelli 1992).

Las células gliales proporcionan glucosa a la neurona en forma transitoria, en el caso de que el cerebro sufra de un período de isquemia. La energía se obtiene mediante glicólisis anaerobia durante un tiempo máximo de cuatro minutos (Siesjö y

Wieloch 1985, Pulsinelli 1992). Durante el metabolismo anaerobio de la glucosa se producen lactato e hidrógeniones, los cuales se acumulan en el tejido cerebral en proporción a la cantidad de glucosa disponible al inicio de la isquemia (Siesjö y cols. 1993, Wagner y Lanier 1994), dando lugar a la reducción del pH intra y extracelular (Kempski 1989). Los hidrogeniones no amortiguados además de disminuir el pH, alteran el funcionamiento de las enzimas glicolíticas en particular la enzima fosfofructocinasa (Mansour 1963). De este modo el incremento anormal de glucosa en el tejido cerebral, debido a un incremento en la glucosa sanguínea antes de la isquemia puede aumentar y acelerar el daño en seres humanos y en animales de experimentación sometidos a isquemia (Wagner y Lanier 1994, Siesjö y cols. 1993). Por otro lado se ha encontrado que, en los sujetos hiperglicémicos la cantidad de fosfatos de alta energía (ATP, ADP y AMP), de glucosa y de glucógeno es mayor hasta los 5 minutos posteriores a la isquemia en comparación con los sujetos normoglicémicos, estas cantidades se igualan a partir de los 10 min. (Wagner y Lanier 1994), de modo que aunque los fenómenos fisiopatológicos provocados por la isquemia se retrasan en su inicio, el daño a los elementos estructurales cerebrales es mayor debido a los productos acumulados durante la glicólisis anaerobia.

Los fenómenos fisiopatológicos provocados por un período de isquemia incluyen también un conjunto de alteraciones celulares que ocurren en forma progresiva y que finalmente, en los tipos celulares especialmente vulnerables, conducen a la lisis de diversos componentes estructurales de las neuronas y a la muerte neuronal. Son diferentes los fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia y por la reperfusión (Pulsinelli 1992, Raichle 1983, White y cols. 1984).

Alteraciones celulares

Como ya se mencionó las bombas iónicas y los intercambiadores normalmente mantienen el gradiente electroquímico y el potencial de membrana a través de la

membrana neuronal. La ATPasa Na^+/K^+ mantiene un gradiente de concentración iónica tanto en el espacio extra como intracelular. Su importancia radica en que muchas funciones membranales son dependientes de estos gradientes, por ejemplo el transporte de glucosa y aminoácidos depende del gradiente de sodio, por otro lado este gradiente de sodio es necesario para el transporte de otras especies iónicas a través de la actividad de los intercambiadores de Na^+/H^+ y de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (Haddad y Jiang 1993).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ extrae calcio e introduce sodio a la neurona en condiciones normales, pero durante la hipoxia se da el efecto contrario siendo este uno de los mecanismos que permiten el incremento de calcio intracelular. El intercambiador Na^+/H^+ , introduce sodio y extrae hidrógeno de la neurona, pero durante la hipoxia su actividad se incrementa y permite la entrada masiva de sodio en la neurona. La concentración de K^+ intracelular normalmente es mayor en comparación con la concentración en el espacio extracelular y el Na^+ se encuentra en situación inversa. Debido a estos mecanismos se puede mantener la polaridad membranal en condiciones normales (Haddad y Jiang 1993, Hansen y Lundbaek 1989).

Durante la isquemia las concentraciones intersticiales de iones se alteran en varias fases. Inicialmente se presenta un período de pocos minutos en el cual las concentraciones de sodio, cloro, potasio y calcio muestran pocos cambios. Minutos después todos los iones se mueven hacia el equilibrio electroquímico. Esto coincide con el desarrollo de una gran deflexión negativa del potencial eléctrico intersticial, llamada despolarización anóxica. Después de esto ya no se observa actividad eléctrica en el cerebro (Hansen y Lundbaek 1989).

La breve despolarización inicial coincide con un incremento en la tasa de disparo de las neuronas, la cual es seguida por la fase de hiperpolarización en la cual la actividad espontánea es detenida y le sigue una segunda fase de despolarización rápida (Hansen y Lundbaek 1989).

La hiperpolarización es debida a la activación de la conductancia al potasio. Los canales de potasio, cuya función se modifica durante la isquemia son de dos tipos: los canales de K^+ activados por Ca^{++} y los canales de K^+ sensibles a ATP, los cuales son normalmente inhibidos por niveles fisiológicos de ATP. La disminución de la concentración citosólica de ATP permite la apertura de estos canales y provoca la hiperpolarización membranar. Es interesante hacer notar que los canales de K^+ sensibles a ATP, pueden ser regulados a través de otros mecanismos como son los niveles de ADP, AMP o el pH intracelular. Esta diversidad en los mecanismos reguladores de los canales de K^+ , puede permitir una mejor adaptación en las alteraciones metabólicas celulares durante la anoxia. Por ejemplo, la reducción del ATP debida a la anoxia puede ser diferente de acuerdo al tipo celular dentro del SNC, así como en los diferentes tipos de células excitables en los mamíferos. De este modo, los diferentes mecanismos reguladores pueden permitir a las células tener una mejor regulación de las propiedades con que cuenta para el manejo de todas aquellas condiciones que pueden dañarlas (estrés ambiental). La importancia de estos canales de K^+ está en reducir la excitabilidad membranar durante la anoxia y así disminuir el consumo de energía y preservar los fosfatos de alta energía en el citosol. En el hipocampo la activación por la anoxia de estos canales, que se encuentran en la membrana presináptica de las neuronas del área CA3, hiperpolariza las terminales presinápticas, disminuye la liberación de los neurotransmisores excitatorios y provoca la hiperpolarización de las neuronas piramidales. La hiperpolarización podría reducir el consumo de energía y prevenir la activación de varios canales de cationes, también reducir el gasto de energía y tener un efecto protector cuando las neuronas están expuestas a la privación de oxígeno, aunque este mecanismo es limitado (Hansen y Lundbaek 1989, Haddad y Jiang 1993).

El influjo de sodio hacia el interior de la neurona se da por la activación de los canales de este catión y la inactivación de las bombas Na^+/K^+ , y a su vez el incremento

del sodio intracelular provoca la entrada de cloro en un intento de neutralizar las cargas eléctricas intracelulares. Al incrementarse las concentraciones intracelulares de sodio y cloro aumenta la osmolaridad y por lo tanto el influjo de agua causando esto último edema y ruptura de la membrana celular (Mitani y cols. 1994).

Los grandes disturbios iónicos celulares, no son debidos únicamente a la ruptura de la integridad de la membrana celular, que permite la entrada de iones para lograr el equilibrio electroquímico con el espacio extracelular, ya que se ha visto que las células cerebrales afectadas, son aún capaces de permitir la salida de iones con un diámetro menor de 8 nm. Este hecho sugiere que los canales iónicos operados por neurotransmisores están involucrados (Hansen y Lundbaek 1989, Haddad y Jiang 1993).

La despolarización anóxica se manifiesta con diferentes latencias dependiendo de la temperatura, de manera que a una temperatura de 39°C se inicia a los 76 seg, y se retarda hasta 326 seg. cuando la temperatura disminuye hasta 25°C (Nakashima y cols. 1995). Esta despolarización provoca la liberación en altas concentraciones de muchos neurotransmisores incluyendo a los aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato (Hansen y Lundbaek 1989, Haddad y Jiang 1993, Mitani y cols.1994).

Los aminoácidos excitatorios en el SNC son el glutamato y el aspartato, que se encuentran en las vesículas sinápticas y son liberados de manera dependiente del calcio por despolarización de las neuronas. Estos aminoácidos en condiciones normales se encuentran en bajas concentraciones en la hendidura sináptica, actúan sobre receptores específicos de alta afinidad y se recapturan a través de un sistema también de alta afinidad que los remueve del espacio extracelular. En la membrana extracelular se encuentran receptores ionotrópicos como son el receptor AMPA/kainato (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiónico) y el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) y los receptores metabotrópicos.

Como ya se mencionó la despolarización anóxica provoca que el glutamato sea liberado de las terminales neuronales glutamatérgicas (por ejemplo, las colaterales de Schaffer, las fibras de la vía perforante y las que provienen de la corteza entorrinal en el campo CA1 del hipocampo) en forma masiva durante los primeros 3 min. pos-isquemia; en cambio, los astrocitos muestran una liberación de glutamato entre los 10 a 20 minutos pos-isquemia (Mitani y cols. 1994). La neurotoxicidad del glutamato involucra dos componentes: el primero ocurre rápidamente y depende del sodio y cloro extracelular y puede ser mimetizado por una alta concentración de K^+ . El incremento en la conductancia al sodio da como resultado la despolarización membranal con un influjo secundario de cloro y agua con el consiguiente edema; estos cambios pueden ser reversibles pero en caso de que sean irreversibles pueden llevar a la lisis celular. Este incremento de sodio intracelular se debe a la apertura de los canales de sodio dependientes de glutamato y a una pequeña contribución de los canales de sodio dependientes de voltaje. El segundo componente depende del calcio extracelular y su influjo hacia la neurona ocurre en forma tardía provocando también daño neuronal. La entrada de calcio se debe a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, que son activados por la despolarización anóxica y de los canales operados por receptores NMDA activados por la liberación excesiva de glutamato y la eliminación del bloqueo del magnesio; el calcio intracelular también se incrementa por su liberación de las pozas intracelulares (Choi 1987).

El aumento anormal de calcio libre intracelular y su permanencia, puede desencadenar varios fenómenos (Meldrum y cols. 1985, Schlaepfer y Zimmerman 1985, Choi 1988, Siesjö 1988, Ikeda y Long 1990, Orrenius y cols. 1992, Tsubokawa y cols. 1992, Reiter 1995, Siesjö y cols. 1995, Chan 1996) al activar fosfolipasas A2 que hidrolizan a los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular incrementando la cantidad de ácidos grasos libres (araquidónico); proteasas que destruyen proteínas estructurales y funcionales (Schlaepfer y Zimmerman 1985); la sintetasa del óxido

nítrico iniciando los mecanismos de daño por radicales libres (Kitagawa y cols.1990, Ikeda y Long 1990, Orrenius y cols. 1992, Reiter 1995, Chan 1996); nucleasas que dañan las cadenas del DNA y a través de la inducción de la expresión de genes específicos relacionados con la reparación y con la muerte neuronal tardía (Orrenius y cols. 1988, Jørgensen y cols. 1989, Onodera y cols. 1989, Kogure y Kato 1993, Smeyne y cols. 1993, Caelles y cols. 1994, Neumann-Hefelint y cols. 1994, Thomson 1995, Steller 1995). Se ha demostrado que 1 hora después de un período de 15 minutos de isquemia puede ocurrir la ruptura de una sola cadena de DNA en las células de la región CA1 del hipocampo del gerbo, pero a las 4 horas se observa el DNA reparado; es posible que el daño transitorio del DNA agrave las alteraciones pos-isquémicas en la síntesis de proteínas o en la transcripción del RNA (Kogure y Kato 1993).

Durante las 48 h pos-isquemia, la síntesis de proteínas en el cerebro generalmente se reduce, pero se ha observado la expresión de genes específicos y la síntesis de sus proteínas, como son los genes inmediatos-tempranos (IEG's): genes c-fos, c-jun, zif/268 (dedos de zinc); las proteínas de choque de calor (HSP70) y la proteína precursora amiloide (Jørgensen y cols. 1989, Onodera y cols. 1989, Kogure y Kato 1993, Smeyne y cols. 1993, Neumann-Hefelint y cols. 1994).

Los productos del c-fos y c-jun forman un complejo, el cual está asociado con los elementos del control transcripcional del DNA contenido en los sitios AP-1 y que para unirse a este sitio usa como motif un zipper de leucina y puede servir como un control que regula a otros genes en respuesta a estímulos exógenos. La presencia de la proteína Fos (proteína sintetizada por la expresión del gen c-fos) dentro del núcleo neuronal representa un marcador visible de la respuesta celular al estímulo hipóxico o isquémico dentro del SNC (Kogure y Kato 1993) que depende tanto de la severidad de la isquemia, como de la naturaleza intrínseca de la población neuronal. La inducción exitosa de esta proteína puede producir resistencia y sobrevivencia de las neuronas

después de la isquemia. Sin embargo, la falla de la proteína Fos está relacionada con la muerte neuronal, aunque se exprese el RNAm (Kogure y Kato 1993).

Los factores que afectan la expresión del gen c-fos durante la isquemia cerebral son: la liberación del glutamato, la despolarización de la membrana, el influjo masivo de calcio, la ruptura de la membrana plasmática y la elevación transitoria de AMPc durante los 3-10 min. iniciales de la reperfusión (Onodera y cols. 1989).

La activación de los receptores NMDA induce la expresión rápida y transitoria del RNAm de varios genes, esta expresión es diferente en cada estructura cerebral. De modo que, en la células granulares del cerebelo se expresan los genes c-fos, c-jun y zif/268, en el hipocampo del gerbo se expresan los genes c-fos y c-jun, pero su expresión es mayor en la región CA3 y la fascia dentada que son áreas resistentes a la isquemia en comparación con la región CA1 que es un área muy vulnerable (Kogure y Kato 1993). En las áreas CA1 y CA4 se han encontrado altos niveles de RNAm del c-fos en las 24-48 h pos-reperfusión, disminuyendo en forma importante a las 72 h. En la corteza cerebral el RNAm del c-fos se incrementa a los 30 min. de recirculación, este incremento persiste por 90 min y disminuye a valores control a las 6 h (Jørgensen y cols. 1989).

Después de un período de isquemia las neuronas pueden morir inmediatamente o varios días después. La primera es el resultado de una forma de daño celular agudo, la cual se observa como edema celular rápido y lisis; en contraste, la última se puede considerar como muerte celular por apoptosis y se caracteriza por la autodigestión controlada de la célula y parece que se inicia a través de la activación de proteasas endógenas, lo que provoca la disgregación del citoesqueleto, la contracción de la célula y el daño membranal. El núcleo se condensa cuando las endonucleasas son activadas y se inicia la degradación del ácido desoxirribonucleico (DNA). La función mitocondrial se pierde, las células moribundas mantienen su membrana celular íntegra aunque alterada. Sin embargo, la alteración de la membrana celular de las células apoptóticas

es una señal para las células fagocitarias vecinas para ser digeridas y así completar el proceso de degradación. Las células que no son inmediatamente fagocitadas se rompen en pequeños fragmentos de membrana llamados cuerpos apoptóticos. Una característica importante de la apoptosis es que las células moribundas eliminadas no provocan respuesta inflamatoria (Thomson 1995).

Intervienen varios genes en la regulación de la muerte celular, el ced-3, el ced-4 y el ced-9 (ced soporte para la muerte celular defectuosa). Al activarse los dos primeros se lleva al cabo la muerte celular y el último evita la muerte celular programada (Steller 1995). La proteína p53 es otro marcador de muerte neuronal aunque su mecanismo de acción aún se desconoce (Caelles y cols. 1994). Se ha observado que el gen "reaper" es capaz de integrar la información tanto intra como extracelular de las diferentes señales para activar el programa de apoptosis (Steller 1995).

Se ha observado que las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo del gerbo mueren entre los 2 a 4 días después de un período de 5 min. de isquemia y que sobreviven únicamente el 5.8% de ellas a las 3 semanas pos-isquemia. Los cambios morfológicos que se observan en las neuronas piramidales son: el encogimiento que ocurre en forma súbita 3 ó 4 días después de la isquemia y la invasión del estrato piramidal por células microgliales cuando las neuronas degeneran (Nitatori y cols. 1995); así como la presencia de inmunorreactividad para las proteincinasas cisteínas (catepsinas B, H y L) en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo y en las células microgliales del estrato piramidal pero no en otras áreas. La expresión de las proteincinasas se incrementa en forma gradual y muestra su máxima expresión al tercer día después de la isquemia, cuando las neuronas piramidales se observan arrugadas. Además se observa una disminución del retículo endoplásmico rugoso y de los polisomas, numerosos cuerpos densos y vacuolas unidas a la membrana que contienen estructuras membranales y del citoplasma llamadas vacuolas autofágicas. Una prueba específica para determinar apoptosis es la

llamada reacción de TUNEL; ésta es positiva en las neuronas 3 días después de la isquemia pero no antes. La membrana nuclear se encuentra frecuentemente indentada. Cuatro días después de la isquemia, las neuronas del área CA1 presentan su núcleo de forma irregular con masas de cromatina densa y además cerca de las células gliales en la misma capa se observan cuerpos apoptóticos que contienen condensaciones de cromatina. Por análisis de Southern Blot se puede observar la fragmentación del DNA al cuarto día pos-isquemia. Estos cambios sugieren que la degradación de las proteínas es provocada después del período de isquemia y precede a la formación de los autolisosomas. Estos hallazgos son consistentes con los criterios bioquímicos y morfológicos de apoptosis y están de acuerdo con Nitatori y cols. (1995) quienes señalan que la muerte neuronal tardía en las neuronas piramidales del área CA1 después de un breve período de isquemia es secundaria a apoptosis y no a necrosis.

Después de un período de isquemia también se incrementa la síntesis de los factores de crecimiento nerviosos y de crecimiento de los fibroblastos que pueden estar relacionados con los procesos de reparación de estructuras neuronales, en los cuales se ha sugerido que participan las células gliales (Kogure y Kato 1993, Neumann-Hefelint y cols. 1994).

Las proteínas de choque de calor de 70 kd (HSP70) son esenciales para la restauración del ensamblamiento normal de los ribosomas, promueven la síntesis de nuevos ribosomas y la recuperación de la morfología nucleolar por mecanismos dependientes de ATP.

Las proteínas HSP70 se producen en mayor cantidad en las áreas menos vulnerables a la isquemia como son el área CA3 y la fascia dentada del hipocampo del gerbo que en las más vulnerables como por ejemplo el área CA1. En el hipocampo de la rata por el contrario, la producción de la proteína HSP70 se observa en áreas vulnerables. En gerbos con un período de 10 minutos de isquemia la cantidad de RNAm de HSP70 alcanza su máxima producción a la 8 h pos-isquemia y continua por

más de 2 días cuando en la corteza ya se encuentra en cantidades muy bajas. Esta continua elevación de la cantidad de RNAm en el área CA1 sugiere que estas neuronas están bajo condiciones de daño persistente. Las alteraciones en la síntesis de estas proteínas a nivel transduccional y quizá a nivel transcripcional puede correlacionarse con los mecanismos excitotóxicos que provocan la muerte neuronal tardía (Kogure y Kato 1993).

Durante la reperfusión, la reducción parcial de una molécula de O_2 , en el caso de que acepte 1 ó 2 electrones en lugar de 4 puede producir radicales superóxido o peróxido de hidrógeno ($\cdot O_2$, H_2O_2), los cuales son muy tóxicos para las neuronas y pueden provocar daño o muerte celular al dañar a los lípidos no insaturados de la membrana plasmática. Las neuronas parecidas a otras células en el organismo, dependen de las enzimas catalasa y la superóxido dismutasa para disminuir la cantidad de radicales libres en la célula (Haddad y Jiang 1993).

Protección neuronal farmacológica

Después del período de isquemia cerebral, existe un intervalo en el cual el tratamiento puede disminuir o evitar el daño neuronal, favoreciendo la recuperación funcional que puede dar como resultado, una disminución de la presencia y la magnitud de las secuelas neurológicas pos-isquemia. A este período se le denomina "ventana terapéutica", la cual puede variar, de acuerdo a la severidad de la isquemia, la temperatura corporal, la magnitud del edema cerebral, las condiciones metabólicas previas y la causa que provocó el evento inicial de la isquemia (Pulsinelli y cols. 1997).

La neuroprotección farmacológica es posible, por el uso de fármacos que incrementen los mecanismos endógenos protectores y aumenten la tolerancia de las diferentes estirpes celulares cerebrales, antes, durante o después de un episodio de isquemia (Fisher y cols. 1994). También los fármacos pueden interferir con algunos de los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia.

La neuroprotección farmacológica en general es más efectiva, si se administra el tratamiento con fármacos antes del período de isquemia y es menor cuando se administra el tratamiento inmediatamente después o tardíamente al período de isquemia (Fisher y cols. 1994).

En los estudios experimentales, la posibilidad de reducir el daño cerebral producido por la isquemia anoxia, se ha basado en parte, en la administración antes o dentro de las primeras horas siguientes a partir del episodio de isquemia, de diferentes fármacos o factores tróficos que puedan atenuar o contrarrestar uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia (Bokesch y cols. 1994, Baskin y Hosobuchi 1981, Safar 1984, Hoff 1986, Warner 1989, Cottrell 1995, Truelove y cols. 1994, Hashimoto y cols. 1994, Hall 1988, Kawakami y cols. 1995, Kohno y cols. 1995, Guan y cols. 1995, Guan y cols. 1996, Bleyaert y cols. 1978, Todd y cols. 1982, Shiu y cols. 1983, Gisvold y cols. 1984, Hallmayer y cols. 1985, Shapiro 1985, Kirino y cols. 1986, Cervantes y cols. 1989, Karlsson y Stten 1989, Schwartz y cols. 1994, Schwartz 1995). La administración de fármacos previa al episodio de isquemia tiene como objetivo principal prevenir la ocurrencia de fenómenos fisiopatológicos iniciales que conducen al daño pos-isquemia (Kochs y cols. 1992, Baskin y Hosobuchi 1981, Safar 1984, Hoff 1986, Warner 1989).

Los antagonistas del receptor NMDA protegen significativamente en contra del daño isquémico en los modelos experimentales. El uso clínico de los antagonistas competitivos del receptor NMDA es limitado puesto que éstos no cruzan la barrera hematoencefálica. El dextrometorfano al ser un antagonista, competitivo y selectivo del receptor NMDA, evita la liberación del glutamato, y previene la expresión del gen c-fos y de esta forma la muerte neuronal (Bokesch y cols. 1994). También se han utilizado bloqueadores de receptores no-NMDA, por ejemplo para el receptor AMPA se ha administrado el YM90K, el cual ha mostrado un efecto protector cuando su administración es inmediatamente después del período de isquemia (Koroshetz y

Moskowitz 1996). Otros bloqueadores del receptor no-NMDA como la ketamina, la fenilclidina y el MK-801 al ser relativamente lipofílicos y poder penetrar la barrera hematoencefálica, podrían ser utilizados en la clínica por sus propiedades neuroprotectoras, después de un evento isquémico (Bokesch y cols. 1994).

El uso de atrapadores de radicales libres y de los inhibidores de la lipoperoxidación reducen el daño cerebral después de un período de isquemia, en particular durante la reperfusión. Experimentalmente se han utilizado fármacos que incrementan la síntesis de las enzimas involucradas en el metabolismo de los radicales libres o fármacos que por su estructura química como el esteroide ácido 21-amino (U74006F) atrapan a los radicales ya formados, mecanismo mediante el cual reducen el daño isquémico en modelos animales (Koroshetz y Moskowitz 1996).

Durante algunos procedimientos quirúrgicos, se ha utilizado como protección neuronal a la hipotermia, de modo que la temperatura cerebral es disminuida y mantenida entre 33 y 34°C. Sí se reduce la temperatura cerebral, se reduce el consumo de oxígeno celular y su metabolismo, lo que retarda el agotamiento del ATP citoplasmático. Esta disminución de la temperatura se ha visto que es utilizada por animales que se mantienen dormidos por un largo período de tiempo o en animales que en su medio ambiente tienen una cantidad muy baja de oxígeno (Koroshetz y Moskowitz 1996). El aplicar este procedimiento inmediatamente después del período de isquemia atenúa el proceso citotóxico primario y tardío, la ruptura de la barrera hematoencefálica y la generación de los radicales libres y la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática.

Los bloqueadores de los canales L de calcio dependientes de voltaje como la nimodipina también han sido utilizados, como un mecanismo para evitar la liberación masiva de neurotransmisores excitatorios, aunque se ha observado que su eficacia es parcial. Por otro lado, se ha visto que la nimodipina previene parcialmente el incremento de calcio intracelular, al evitar su salida de la mitocondria y al bloquear en

forma selectiva a los canales L de calcio en la membrana citoplasmática. Este incremento del calcio intracelular se debe a su entrada por los otros canales de calcio insertados en la membrana celular. Clínicamente el uso de los bloqueadores de los canales L de calcio no ha tenido la eficacia que se esperaba.

También se han utilizado los bloqueadores de los canales N de calcio como el SNX111, que aunque han sido eficaces al atenuar la liberación de neurotransmisores excitatorios y el incremento de calcio intracelular no son ampliamente usados debido a los severos efectos colaterales que producen como la severa hipotensión arterial al bloquear al sistema simpático (Koroshetz y Moskowitz 1996).

La administración de la lamotrigina, lubeluzole, riluzole y fosfenitoina, reducen la liberación de neurotransmisores excitatorios al bloquear a los canales de sodio e impedir su influjo en la terminal presináptica, lo que provoca una disminución del daño isquémico en modelos animales (Koroshetz y Moskowitz 1996).

Otros procedimientos protectores que han sido utilizados son: el incrementar la producción de óxido nítrico, el uso de neurotrofinas o factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la modificación de los programas genéticos de muerte celular por el empleo del gen Bcl-2 (Koroshetz y Moskowitz 1996).

Agonistas GABAérgicos

Se ha demostrado que la administración de fármacos como los barbitúricos, las benzodiazepinas y los esteroides anestésicos pueden reducir algunas de las alteraciones provocadas por la isquemia cerebral en animales de experimentación (Hallmayer y cols. 1985, Shapiro 1985, Kirino y cols. 1986, Cervantes y cols. 1989, Karlsson y Stten 1989, Schwartz y cols. 1994, Schwartz 1995) y en seres humanos (Schmidt-Kastner y cols. 1990). Estos efectos han sido atribuidos al incremento de la neurotransmisión GABAérgica, inhibitoria, en los circuitos neuronales que forman parte de las estructuras cerebrales vulnerables a la isquemia. Se ha probado que los

agonistas directos del receptor GABA_A como el muscimol, así como otros fármacos agonistas indirectos protegen del daño neuronal provocado por la isquemia (Gee y cols. 1988, Cervantes y cols. 1989, Turner y cols. 1989, Johansen y Diemer 1991, Jussofie 1993, Dunn y cols. 1994, Kenneth 1994, Cervantes y cols. 1995, Shuaib y cols. 1995). De este modo, la reducción de la excitabilidad neuronal ha sido señalada como el mecanismo por el cual los esteroides anestésicos evitan el daño cerebral pos-isquemia (Atkinson y cols. 1965, Saji y Reis 1987, Cervantes y cols. 1989).

Neurotransmisor inhibitorio GABA

En los mamíferos, el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido γ -amino-butírico) se encuentra localizado en el SNC, con una distribución topográfica diferencial. Se localiza en las terminales nerviosas de estructuras cerebrales particulares de donde es liberado por un estímulo despolarizante dependiente del calcio (Jussofie 1993). El GABA interacciona con receptores pos-sinápticos y después de su liberación es removido del espacio sináptico por un sistema de recaptura de alta afinidad. En el SNC de los mamíferos, la aplicación iontoforética de GABA usualmente resulta en una respuesta pos-sináptica inhibitoria hiperpolarizante, la cual al ser bloqueada por bicuculina involucra al receptor GABA_A acoplado a un canal de cloro (Gee y cols. 1988).

En el hipocampo, en la capa de células piramidales/granulares y en la capa molecular y se ha mostrado una gran actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en las interneuronas locales. Existe una gran cantidad de botones sinápticos que contienen GAD/GABA alrededor de las células piramidales/granulares, provenientes de los axones de las células en cesta. También se ha encontrado un tipo de interneuronas distintas de las células en cesta, las cuales son responsables de la gran cantidad de botones terminales GABAérgicos que se localizan exclusivamente sobre los segmentos iniciales de los axones de las células piramidales (Fonnum 1987).

Mucha de la actividad GABAérgica de la sustancia nigra deriva de las neuronas del neostriatum, una menor actividad proviene de las neuronas del globo pálido y una mucho menor actividad se debe a las células GABAérgicas locales de la pars reticulata. Aproximadamente el 80 % de las terminales en la sustancia nigra pars compacta y virtualmente cada soma y dendrita en la pars reticulata están asociadas con terminales GABAérgicas. Las células GABAérgicas de la sustancia nigra establecen proyecciones hacia el colículo superior, ciertos núcleos talámicos y hacia el área tegmental ventral (Fonnum 1987).

El receptor GABA_A es el responsable de la mayor parte de la inhibición de la excitabilidad neuronal en el SNC de los vertebrados, está ampliamente distribuido en el SNC y es el sitio de acción de un número importante de drogas que actúan en el SNC (benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides). Existe una gran concentración de receptores GABA_A en neuronas de la corteza frontal, la capa celular granulosa del cerebelo, el bulbo olfatorio, la sustancia nigra y el núcleo geniculado medial del tálamo. En el hipocampo en las áreas CA1-CA4: la capa de células granulosas y los cuerpos de las neuronas piramidales contienen cantidades moderadas del receptor GABA_A en comparación con las otras capas, siendo estos receptores en las células piramidales los responsables de la inhibición provocada por las células en cesta (Bowery y cols. 1987).

La administración de estrógenos o su combinación con progesterona incrementa en forma significativa el número de receptores GABA_A de alta afinidad regulando de esta manera la actividad neuronal en la formación del hipocampo, en el área CA1 y en la capa molecular dorsal de la fascia dentada (Schumacher y cols. 1989).

La sustancia nigra contiene una moderada cantidad de receptores GABA_A, encontrándose la mayor concentración en la zona de la pars reticulata en comparación con la pars compacta (Bowery y cols. 1987).

Los estudios electrofisiológicos sobre el receptor de GABA_A han mostrado que este canal es selectivo para el anión cloro y su activación por GABA provoca un incremento en la conductancia al cloro, lo que usualmente resulta en una hiperpolarización de la membrana neuronal, reduciendo la probabilidad de que se genere un potencial de acción. Si se incrementa la concentración del agonista, se incrementa la frecuencia de apertura del canal de cloro y el tiempo promedio de apertura. Los sitios de reconocimiento para barbitúricos, benzodiazepinas y GABA se encuentran localizados en diferentes sitios del ectodominio del receptor (Schumacher y cols. 1989).

El receptor GABA_A está formado por cinco subunidades distintas, en un arreglo pentamérico, formando así en el centro un canal. Se han encontrado 6 diferentes subunidades α , 4 subunidades β , 3 subunidades γ y una subunidad δ . La co-expresión de estas subunidades permite la combinación de las mismas, lo cual le confiere al complejo propiedades farmacológicas específicas; por lo tanto la respuesta neuronal hacia el GABA está influenciada por una expresión diferencial de las subunidades α , la cual varía en las diferentes regiones del cerebro y puede servir a su vez para generar una gran diversidad de respuestas al GABA como un mecanismo importante de plasticidad sináptica (Harrison y cols. 1987, Levitan y cols. 1988).

Esteroides y Sistema Nervioso Central

Bajo condiciones experimentales, algunos esteroides naturales ejercen acciones anestésicas; así desde que en 1927 Cashin y Moravck reportaron la inducción de anestesia con la administración intravenosa de una suspensión coloidal de colesterol en gatos, se ha continuado con el estudio de las propiedades anestésicas de estos compuestos. Los mecanismos de acción del colesterol eran desconocidos y se pensó que desordenaba a los lípidos de la membrana celular de una manera no específica, con la subsecuente alteración de la actividad neuronal. Cuando se descubrieron

posteriormente las propiedades hipnótico-sedantes de los esteroides, se asumió que actuaban de manera similar al colesterol (Willmer, 1961; Reddy y cols. 1989, Clarke y cols. 1990); sin embargo, se creía que podían tener diferentes mecanismos de acción (Paul y Purdy 1992). Selye (1941,1942) fue el primero en describir la actividad hipnótica-sedante de la progesterona y de la desoxicorticosterona e identificó que los metabolitos reducidos en el anillo A eran más potentes que la progesterona.

Los compuestos químicos esteroides endógenos y sintéticos que tienen efectos en el SNC pueden modificar el funcionamiento neuronal mediante varios mecanismos celulares. Un primer mecanismo consiste en sus acciones sobre los procesos celulares de la transcripción del DNA, mediado por un receptor intracelular, que dan lugar a fenómenos que ocurren con una latencia relativamente larga, de horas a días (DeVoogd y Nottebohm 1981, Arnold 1984, Kurtz y cols. 1986, Leedy y cols. 1987). Un segundo mecanismo es el ya mencionado sobre la alteración de la fluidez de la bicapa lipídica. Un tercer mecanismo se lleva al cabo a través de la activación de segundos mensajeros que activan al receptor intracelular de esteroides para su posterior transcripción. Un cuarto mecanismo es aquel en el cual el esteroide se une a un receptor de membrana que está acoplado a un canal de calcio, actualmente no se sabe que tipo de receptor es ni cual es su importancia fisiológica, pero se ha observado este efecto durante la reacción acrosomal del espermatozoide, y en la activación de las enzimas de degradación durante la ovulación. El quinto mecanismo es una extensión del clásico mecanismo genómico e interviene la interacción del complejo ligando-receptor con el DNA, pero en este mecanismo, el esteroide se inserta dentro del DNA en un dominio llamado elementos de respuesta a hormonas (HREs) que es muy específico para un determinado esteroide, de manera que puede iniciarse el proceso de transcripción. Un sexto mecanismo se relaciona con fenómenos de inhibición de la excitabilidad neuronal que se asocia con los efectos sedantes, anticonvulsivantes y anestésicos de latencia breve (segundos a minutos) inducidos por algunos esteroides

endógenos o exógenos y que son atribuibles a sus acciones membranales y a modificaciones de diversos procesos de neurotransmisión inhibitoria a través del receptor membranal GABA_A (Raisinghani y cols. 1968, Kubli-Garfias y cols. 1976, Nabekura y cols. 1986, Schumacher 1990, McEwen 1991, Orchinik y McEwen 1993, Mahesh y cols. 1996, Rupprecht y cols. 1996).

Los esteroides neuroactivos son aquellos que independientemente de su fuente, ya sea periférica o sintetizados de "novo" en el SNC, pueden encontrarse y acumularse en el SNC y ejercer su efecto sobre el receptor GABA_A ubicado en la membrana neuronal, aumentando la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria (Myerburg y cols. 1980, Dearden 1985, Graham 1985, Heuser y Guggenberger 1985, Hossman 1985, Kaplan y cols. 1987).

La síntesis "de novo" de diversos compuestos de naturaleza esteroide a partir del colesterol, capaces de modificar la excitabilidad neuronal de manera relativamente rápida, se ha mostrado en las células gliales en el SNC (Jung-Testas y cols. 1989, Baulieu 1991, Baulieu 1992, Paul y Purdy 1992, Mellon 1994). Las enzimas involucradas en la esteroidogénesis en el tejido cerebral, han sido identificadas en las células gliales: el citocromo P450_{scc} (side chain clavage) se ha localizado en las mitocondrias de los oligodendrocitos y la enzima 5 α -reductasa se ha encontrado en altas concentraciones en la mielina. Se ha identificado la síntesis de pregnenolona (Δ 5P) a partir del colesterol. La Δ 5P es transformada en progesterona también en las células gliales, selectivamente en astrocitos tipo I. La P₄ puede ser parcialmente convertida en sus metabolitos 5 α -reducidos: 5 α -DHP (5 α -pregnan-3,20 diona, 5 α -dihidroprogesterona) y 3 α ,5 α -THP (3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona, 3 α -5 α -tetrahidroprogesterona, alopregnanolona) en el cerebro de ratas recién nacidas. La dehidroepiandrosterona (DHA) es otro esteroide sintetizado en el tejido cerebral, pero su precursor bioquímico es desconocido (Copérchot y cols. 1983, Yi Hu y cols. 1987, Baulieu 1991, Baulieu 1992, Purdy y cols. 1992, Costa y cols. 1994).

Se ha mostrado que los componentes celulares del SNC son capaces de producir esteroides neuroactivos mediante la biotransformación de P_4 y otras progestinas sintetizadas en glándulas periféricas.

Los esteroides neuroactivos incluyen la alfadolona, la 4-pregnen-3,20-diona (P_4), la 5α -pregnan-3,20-diona (DHP), 17- hidroxiprogesterona (17-OH-P), la dihidrotestosterona (DHT), la desoxicorticosterona (DOC), la alotetrahidroDOC, la 5α -pregnan-3 α ,21-diol-20-ona (THDOC), la 5α -pregnan-3 α -ol-20-ona (THP), la dehidroepiandrosterona (DHEA), el 5α -androstan-3 α ,17 β -diol (3 α ,17 β -diol), la 5β -pregnan-3 α -ol-20-ona, la 5β -pregnan-3,20-diona y su eficacia para modificar la excitabilidad neuronal ha sido bien sustentada (Kubli-Garfias y cols. 1976, Martini y cols. 1993, Mellon 1994).

Existe evidencia experimental que indica que los esteroides neuroactivos al tener un sitio de reconocimiento en el dominio transneuronal del receptor $GABA_A$ incrementan la neurotransmisión GABAérgica e inhiben la excitabilidad neuronal (Gee y cols. 1987, Smith y cols. 1987, Johansen y Diemer 1991, Purdy y cols. 1992, Hill-Venning y cols. 1992, Cononaco y cols. 1993).

Se ha propuesto que los esteroides neuroactivos y los neuroesteroides pueden tener dos puntos de contacto en la zona de reconocimiento del receptor $GABA_A$ a través de dos grupos funcionales polares con sus porciones hidrofóbicas en contacto permanente con la cadena de ácidos grasos de los fosfolípidos que rodean al receptor $GABA_A$. Tales interacciones pueden demandar requerimientos estructurales específicos para los ligandos ya que sus dos grupos polares deben de estar colocados en una orientación espacial particular. Por tal motivo se ha visto que modificaciones en la estructura química de los esteroides pueden modificar su potencia biológica (IM y cols. 1989, Giusti y cols. 1992).

La estructura básica requerida para que un esteroide sea activo sobre el receptor de $GABA_A$ comprende el anillo A reducido en su conformación 5α o β , un

hidroxilo en el C3 en configuración α (no en β), y una cetona en el C20; otras modificaciones en su esqueleto pueden modificar su potencia (Selye 1942, Harrison y cols. 1987). La 3α - 5α -pregnan- 20α -ona (3α - 5α -THP; alopregnanolona) y la 3α - 21 -dihidroxi- 5α -pregnan- 20α -ona (THDOC) son los derivados de la progesterona y de la desoxicorticosterona más activos, puesto que aumentan la respuesta provocada por el GABA (Rupprecht y cols. 1996). Los derivados de la progesterona que le siguen en potencia son la 5α -pregnan- 3α - 21 -diol- 20α -ona (5α -DHP; epipregnanolona), la 5α -pregnan- 3α -ol- $11,20$ -diona, la 5β -pregnan- 3α -ol- 20α -ona y la 5β -pregnan- 3α -ol- $11,20$ -diona (Harrison y cols. 1987).

Los pregnanos incrementan la respuesta provocada por el neurotransmisor GABA, por las benzodiazepinas y por barbitúricos, lo que indica que su sitio de unión es diferente al de estos ligandos (Harrison y cols. 1987).

Se ha observado que los pregnanos reducidos en el anillo A en configuración 5α o 5β , pueden tener un efecto inhibitorio del 100% al desplazar al TBPS (t-butilbiciclofosforotionato, antagonista que provoca convulsiones), sin embargo el 5α es más eficaz que el 5β al ser administrado en una concentración menor del 62 % que la requerida por este último (Gee y cols. 1988).

Debido a que la distribución de las subunidades α del receptor $GABA_A$ es heterogénea en el SNC y que las variantes parece que responden diferencialmente al metabolito 5α pregnan- 3α -ol- 20α -ona (3α -OH-DHP), es posible que la magnitud de la respuesta a los neuroesteroides pueda variar regionalmente. La combinación de las subunidades en el receptor $GABA_A$ más eficaz en el humano es la $\alpha 3 \beta 1 \gamma 2$ (Lan y cols. 1991). Para el tipo de receptor $GABA_A$ sensible a las benzodiazepinas se requiere la combinación $\alpha\beta\gamma$ (Gee y cols. 1988). Los esteroides interactúan con un receptor $GABA_A$ que tenga una combinación de subunidades $\alpha 1 \beta 1$, y $\alpha 1 \beta 1 \gamma 2$, (Giusti y cols. 1992).

Actividad eléctrica cerebral e isquemia

Pocos estudios han abordado el análisis de la actividad eléctrica neuronal asociada con los fenómenos fisiopatológicos provocados por la isquemia-anoxia. Sin embargo, los efectos de la isquemia-reperfusión sobre la excitabilidad neuronal inicialmente y sobre el daño y muerte neuronal en las horas y en los días posteriores, se manifiestan como alteraciones en la actividad neuronal unitaria, en la actividad multineuronal (AMN) y en el electroencefalograma (EEG) (Suzuki y cols. 1985). Así se ha descrito un aumento de la actividad unitaria en las neuronas del área CA1 del hipocampo en gerbos, 7 a 24 h después de un período de 5 min. de isquemia-anoxia, que es seguido por una reducción severa de esta actividad 24 h después (Suzuki y cols. 1985). Se han encontrado también disminuciones significativas en la frecuencia de la descarga multineuronal de la formación reticular mesencefálica, del hipocampo y de la amígdala basolateral en las horas siguientes y que persisten al menos, durante 7 días después de un episodio de isquemia-anoxia cerebral global aguda en gatos (Cervantes y cols. 1989, Cervantes y cols. 1995), así como signos electroencefalográficos de lesión cerebral, como son: EEG isoeléctrico inmediatamente después del PCR, actividad de ondas lentas parecidas a las ondas delta (< 4 Hz), con descargas intermitentes con una frecuencia entre 6-15 Hz y espigas aisladas (Cervantes y cols. 1995)

Entre ellos, se ha observado que la isquemia cerebral puede alterar la frecuencia, amplitud, abundancia, topología, reactividad y variabilidad del EEG; puede alterar algunos de los ritmos normalmente presentes como el ritmo α , μ y las reacciones fóticas, incrementar la actividad δ y reducir o eliminar el ritmo θ hipocámpico; también puede provocar la aparición de actividades normalmente ausentes como la actividad δ rítmica intermitente frontal o de descargas epileptiformes lateralizadas periódicas (PLED's) (Van Huffelen y cols. 1984, Contreras 1994).

La magnitud y diversidad de las anomalías en la AMN y en el EEG encontradas es máxima inmediatamente después del período de isquemia y disminuye con el transcurso del tiempo después de la misma (Van Huffelen y cols. 1984, Cervantes 1993).

La actividad eléctrica cerebral también puede ser modificada por la acción de progestinas naturales al provocar la sincronización del EEG cortical e inhibir la AMN de la formación reticular mesencefálica, del hipocampo y del hipotálamo. Las progestinas reducidas en su posición 5β como son la pregnanolona, la epipregnanolona y la pregnandiona inhiben la descarga neuronal y sincronizan el EEG con latencias cortas después de su administración intravenosa y en dosis bajas en comparación con las progestinas reducidas en la posición 5α como la alopregnanolona y la alopregnandiona. La administración de epipregnanolona disminuye la frecuencia de disparo neuronal en las estructuras cerebrales localizadas en la porción rostral al tallo cerebral, por ejemplo en el hipotálamo y el hipocampo (Kubli-Garfias y cols. 1976).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes expuestos:

- 1) El incremento de la neurotransmisión GABAérgica tiene un efecto protector.
- 2) Los neuroesteroides y esteroides neuroactivos incrementan la neurotransmisión GABAérgica.
- 3) La progesterona y algunos de sus metabolitos han demostrado que tienen la capacidad de incrementar la neurotransmisión GABAérgica.

HIPÓTESIS

- 1) El tratamiento con progesterona reducirá las alteraciones de la actividad multineuronal provocadas por isquemia-anoxia cerebral global aguda en el hipocampo, la sustancia nigra pars reticulata y la formación reticular mesencefálica del gato.

- 2) El tratamiento con progesterona reducirá las deficiencias neurológicas provocadas por un periodo de isquemia-anoxia cerebral global aguda en el gato.

- 3) El tratamiento con progesterona preservará la población neuronal de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo y de la sustancia nigra pars reticulata del gato después de un período de isquemia-anoxia cerebral global aguda.

OBJETIVOS

- 1) Analizar los efectos de la progesterona sobre las alteraciones de la actividad multineuronal del hipocampo, la sustancia nigra pars reticulata y la formación reticular mesencefálica, provocadas por isquemia-anoxia cerebral global aguda consecutiva a paro cardiorrespiratorio en el gato.

- 2) Analizar los efectos de la progesterona sobre las deficiencias neurológicas provocadas por un periodo de isquemia-anoxia cerebral global aguda consecutiva a paro cardiorrespiratorio en el gato.

- 3) Analizar los efectos de la progesterona sobre la población neuronal de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo y de la sustancia nigra pars reticulata, provocadas por un periodo de isquemia-anoxia cerebral global aguda consecutiva a paro cardiorrespiratorio en el gato.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 18 gatas (*Felis catus*) adultas (2.5-3.0 kg de peso corporal). Los animales fueron ovariectomizados por vía abdominal, bajo anestesia con pentobarbital sódico iv 35 mg/kg; 7 días después también bajo anestesia con pentobarbital sódico iv, se les implantaron a permanencia electrodos bipolares concéntricos en las siguientes estructuras cerebrales: hipocampo (HIP, anterior 0.5, lateral derecha 7.5 y profundidad +7.0); sustancia nigra pars reticulata (SNr, anterior 3.5, lateral izquierda 5.0 y profundidad -3.5); y formación reticular mesencefálica (FRM, anterior 2.0, lateral derecha 3.5 y altura -2.0) de acuerdo con las coordenadas del atlas estereotáxico de Snider y Niemer (1961). Al mismo tiempo, dos agujas de acero inoxidable fueron implantadas en el hueso suprayacente a la corteza parietal (CP) como electrodos corticales y otra fue implantada en el seno frontal como electrodo de referencia. Los electrodos bipolares concéntricos fueron contruidos con alambre de nicromo (60 μ m de diámetro) aislado, colocado dentro de una cánula de acero inoxidable calibre 25, cubierta de barniz aislante, excepto en una pequeña superficie de 1 mm en la punta de la misma de donde sobresale aproximadamente 1 mm el extremo del alambre de nicromo con su superficie de sección. Los electrodos se unieron a las terminales de un conector, el cual fue fijado al cráneo de cada gata mediante cemento acrílico.

Quince días después de la implantación de los electrodos se obtuvieron en cada gata registros simultáneos del electroencefalograma (EEG) de la CP y el EEG y la actividad multilineuronal (AMN) en el HIP, SNr y FRM en la condición conductual de alerta (atento-quieto). La técnica básica para el registro del EEG y AMN en estas condiciones ha sido descrita anteriormente y utilizada en forma rutinaria en nuestro laboratorio (Winters y cols. 1967, Buchwald y cols. 1973, Cervantes y cols. 1989). Cada animal se colocó dentro de una caja metálica sonoamortiguada (70 x 60 x 50 cm), con una pared de vidrio acondicionada para la obtención del registro de la actividad eléctrica cerebral y para la observación de su conducta y de su actividad motora de

manera simultánea. Se utilizó un cable flexible acoplado por una parte al conector que contiene las terminales de los electrodos y que se encuentra fijo al cráneo de la gata y por otra parte a los conectores de entrada de los canales de un polígrafo Grass modelo 7B para el registro de la actividad eléctrica cerebral. En el polígrafo las señales de la corteza y de las estructuras subcorticales se amplifican en un preamplificador y se filtran enviando las de frecuencia baja (EEG) a un amplificador y las de frecuencia alta a un analizador para el procesamiento de la actividad multineuronal. La salida del amplificador del polígrafo conectada al sistema de operación de las pajillas del mismo, dió lugar a la obtención del registro gráfico en papel del EEG de la corteza y las estructuras subcorticales. En el analizador de la actividad multineuronal, los potenciales de acción de mayor magnitud (usualmente los potenciales contenidos en el tercio superior del registro de la actividad multineuronal) fueron seleccionados de la actividad multineuronal total de las estructuras subcorticales por medio de un circuito de compuerta que con cada uno de estos potenciales generaba un pulso cuadrado de 2 voltios de amplitud y un milisegundo de duración. Estos pulsos alimentaron a un circuito generador de escalera el cual dio lugar a un escalón cuando recibía cada pulso y una vez admitidos 16 pulsos restauraba su nivel de cero, para iniciar otro escalamiento. La salida del generador de escalera se conectó al sistema de operación de las pajillas del polígrafo, de tal manera que el número de escaleras registradas en el papel, multiplicado por 16, por unidad de tiempo es un indicador de la frecuencia de descarga de la actividad multineuronal. En cada animal se tomó un registro de la actividad eléctrica cerebral control a las 7:45 AM antes de cualquier tratamiento, y registros diarios a la misma hora durante los 7 días bajo tratamiento antes y 7 días después del período de isquemia aún bajo tratamiento y 7 días más al suspender el mismo (Figs. 1 y 2).

En cada uno de los animales se efectuó una evaluación neurológica antes del período de isquemia (control) y una diaria durante los 7 días posteriores al mismo, de

acuerdo al procedimiento descrito por Todd y cols. (1982), el cual permite evaluar: el nivel de conciencia, 0-15 puntos; la respiración, 0-10; los pares craneales, 0-10 puntos; los reflejos espinales, 0-21 puntos; los patrones conductuales, 0-8 puntos y el equilibrio 0-25 (Anexo 1). En esta evaluación neurológica un gato normal obtiene un puntaje de 0, en tanto que un animal con deficiencia neurológica severa puede obtener hasta 100 puntos (estado premortem). Todos los animales debieron tener puntaje de cero en la evaluación control para ser incluidos en el estudio.

Luego de la obtención del registro control de la actividad eléctrica cerebral, las gatas fueron asignadas en forma aleatoria a cualquiera de los siguientes grupos:

Grupo I.- Seis gatas expuestas a maniobras simuladas (sham). En cada uno de los animales se realizaron las mismas maniobras efectuadas en las gatas de los otros dos grupos, a excepción de la inducción del paro cardíaco, la detención de la ventilación pulmonar y el procedimiento para la reanimación .

Grupo II.- Seis gatas expuestas a un período de isquemia-anoxia de 15 min. de duración y hasta 4 min. de maniobras de reanimación, las cuales recibieron tratamiento con el vehículo de la progesterona (aceite de maíz) 0.5 ml/kg/día sc, 7 días antes y 7 días después del episodio de isquemia.

Grupo III.- Seis gatas expuestas a un período de isquemia-anoxia de 15 min. de duración y hasta 4 min. de maniobras de reanimación, las cuales recibieron tratamiento con progesterona, 10 mg/kg/día sc, en un volumen de 0.5 ml/kg/día 7 días antes y 7 días después del episodio de isquemia.

Se obtuvieron muestras de sangre (1 ml) de todas las gatas a los días cero, dos, cuatro y siete de tratamiento, para medir la concentración de P₄ circulante en el suero por medio de un método de inmunoensayo automático. El suero fue separado inmediatamente después de tomada la muestra sanguínea y almacenado a -4°C hasta que se realizó el análisis. La concentración de P₄ fue medida por un método de inmunoensayo utilizando una enzima quimioluminiscente de un estuche comercial

(IMMULITE Progesterone, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EEUU). El límite de detección para P₄ fue de 0.09 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 6 y 8.5 % respectivamente.

Al séptimo día de tratamiento cada gata de los grupos II y III fue sometida a un período de 15 min. de isquemia cerebral global como resultado de paro cardiorrespiratorio (PCR), seguido de hasta 4 min. de maniobras de reanimación, de acuerdo a un modelo de isquemia cerebral global aguda utilizado en nuestro laboratorio y el grupo I fue sometido a maniobras sham. El PCR o las maniobras sham se realizaron de la forma siguiente: las gatas fueron anestesiadas con halotano al 4% en oxígeno en una caja de Plexiglas. En cada uno de los animales se efectuó bloqueo neuromuscular con bromuro de pancuronio 0.3 mg/Kg administrado iv a través de un catéter endovenoso colocado en una pata trasera y se realizó intubación endotraqueal para aplicar ventilación mecánica controlada (Respirador Bird Mark VIII) con halotano al 1.5% en oxígeno para mantener la anestesia y con frecuencia respiratoria de 20 a 24 respiraciones por minuto con una fracción inspiratoria de oxígeno (FiO₂) de 0.21 para mantener la presión arterial de bióxido de carbono (PaCO₂) entre 30 y 35 mmHg.

Previa infiltración de la piel con 1 ml de lidocaina al 2% se realizó una incisión de 1 cm en el cuello y otra en la región inguinal derecha. A través de la vena yugular se insertó un catéter estéril hasta la aurícula derecha, el cual sirvió como guía para la inserción de un electrodo de acero inoxidable de 0.75 mm de diámetro, cuya punta sobresale 2 mm del extremo distal del catéter en la aurícula, la localización precisa de la punta del electrodo fue confirmada por medio de un electrocardiograma (ECG) intracavitario. Otro catéter estéril fue insertado en la arteria femoral derecha para registrar en forma continua la presión arterial media (PAM). Una vez que la cirugía se completó, las heridas del cuello y de la región inguinal fueron suturadas.

Paro cardiorrespiratorio

En cada animal se iniciaron las maniobras experimentales de paro cardíaco o sham con valores de pH, gases en sangre y glucosa dentro de límites fisiológicos.

La administración de halotano fue interrumpida y un minuto después se provocó fibrilación ventricular en las gatas de los grupos II y III mediante el paso de corriente eléctrica (60 Hz, 20 V, 5 a 10 segundos), a través del electrodo intraauricular ubicado en la aurícula derecha y de un electrodo subcutáneo colocado en el apex hasta que la PAM mostró una caída brusca a menos de 10 mmHg. En ese momento la ventilación mecánica fue suspendida. Cinco minutos después de iniciado el PCR, el electrodo colocado en la aurícula derecha fue retirado. El paro cardíaco y la detención de la ventilación pulmonar se mantuvieron durante 15 min.

Al término de los 15 minutos de paro cardíaco y detención de la ventilación mecánica se iniciaron las maniobras de reanimación: se aplicó ventilación mecánica controlada con $FiO_2 = 1$, masaje cardíaco externo para incrementar y mantener la PAM entre 90 y 110 mm Hg, administración de bicarbonato de sodio 1 mEq/kg iv y de clorhidrato de epinefrina 15 μ g/kg iv; aproximadamente a los 2 minutos de iniciadas las maniobras de reanimación se procedió a inducir la desfibrilación cardíaca mediante una descarga de 20 Julios aplicada sobre las paredes del tórax mediante las placas de un desfibrilador (Mennen Cardiopak Modelo 936). En caso de que no se recuperara la PAM, se aplicó una nueva dosis de bicarbonato de sodio, 1mg/kg iv, de clorhidrato de epinefrina, 15 μ g/kg iv y se repitió la desfibrilación hasta lograr que la PAM alcanzara y mantuviera valores de 90 mm Hg. En caso necesario se administró sulfato de atropina 50 μ g/kg iv y clorhidrato de lidocaina 1 mg/kg iv según requerimientos para estabilizar el ritmo cardíaco. La presión arterial media debió alcanzar y mantenerse entre 90 y 110 mmHg en el término de 4 min. a partir del inicio de las maniobras de reanimación y mantenerse en esos valores durante las 6 h siguientes al episodio de isquemia para que las gatas fueran incluidas en el estudio. El ECG fue registrado continuamente a

través de electrodos de aguja subcutáneos. Se registró la temperatura rectal cada hora y se colocó una lámpara de 60 watts a 20 cm. del tórax a fin de que la temperatura corporal se mantuviera entre 36 y 36.5°C. Se tomó una muestra de sangre arterial (1ml) para la determinación del pH y exceso de base, bicarbonato, presión arterial de oxígeno (PaO₂) y PaCO₂ con un analizador pH-Blood Gas-CIBA Corning 2381, 15 min. antes del PCR y a los 10, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la reanimación y se realizaron las correcciones necesarias para mantener el pH entre 7.35 y 7.40 y la PaCO₂ entre 30 y 35 mm de Hg. Se determinaron también los valores de glucosa sanguínea durante las 6 h siguientes al episodio de isquemia.

La ventilación asistida se mantuvo con FiO₂= 1 durante 1 h después del PCR o de las maniobras simuladas y con FiO₂= 0.4 durante 5 h más.

Cada uno de los animales se mantuvo con bloqueo neuromuscular hasta 6 horas después del episodio de isquemia; durante este período se tomaron registros de la actividad eléctrica cerebral a los 30 min. pos-isquemia y después cada hora.

Las gatas del grupo I no recibieron el paso de corriente alterna a través del electrodo insertado por el catéter en la vena yugular ni la ventilación mecánica fue detenida, de modo que estas gatas no estuvieron sujetas a paro cardiorrespiratorio ni a maniobras de reanimación, únicamente estuvieron sujetas a maniobras simuladas, incluyendo el bloqueo neuromuscular, los procedimientos quirúrgicos y la ventilación mecánica asistida durante 6 h.

Al término de este período se revirtió el efecto del bromuro de pancuronio con neostigmina 0.06 mg/kg iv y sulfato de atropina 0.04 mg/Kg iv para prevenir la bradicardia.

Las cánulas insertadas en la vena yugular y en la arteria femoral fueron retiradas bajo anestesia con halotano, las heridas fueron suturadas y se retiró la cánula endotraqueal una vez que se reinició la actividad respiratoria en forma espontánea. Después de la extubación, cada gata fue colocada en una caja a una temperatura de

25°C durante 24 h pos-paro. Los siguientes días las gatas fueron mantenidas con alimento y agua *ad libitum*. En caso necesario se le administró a cada animal solución salina al 0.9 %, 50 ml/kg/día sc para mantenerlas hidratadas.

Se calculó la pérdida total de sangre durante el experimento y el suministro de soluciones (NaCl 0.9%) tratando que los volúmenes fueran equivalentes.

Seguimiento y estudio histológico

El tratamiento con P₄ o vehículo se continuó durante 7 días después del PCR o de las maniobras simuladas.

Cada gata se sometió a una evaluación neurológica diaria en forma ciega por dos observadores durante los 7 días posteriores al PCR, evaluando los parámetros mencionados anteriormente y detallados en el anexo 1. A cada alteración neurológica se le asignó un puntaje, de modo que se pudieron evaluar las deficiencias neurológicas provocadas por la isquemia y su recuperación en los días posteriores al PCR, así como los cambios que pudieran haber ocurrido por las maniobras simuladas.

Se efectuaron registros diarios del EEG de la corteza parietal y el EEG y la AMN del HIP, la SNr y la FRM en el estado conductual de alerta durante 7 días a partir del día siguiente al PCR, todavía bajo tratamiento con vehículo o P₄ y durante 7 días más, ya sin tratamiento. Se determinó la frecuencia de descarga multineuronal de las estructuras subcorticales en todos los animales de la misma manera a como se llevó al cabo antes del PCR.

Catorce días después del episodio de isquemia, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, 35 mg/kg iv, se expuso el corazón mediante toracotomía, se colocó una aguja hipodérmica del número 14 en el ventrículo izquierdo y se perfundió con 400 ml de solución salina fisiológica al 0.9 % luego del pinzamiento de la aorta abdominal y de un corte en la orejuela derecha para permitir el drenaje de esta solución junto con la sangre contenida en el árbol vascular de la porción superior

del cuerpo; a continuación, se administraron por la misma vía 800 ml de formol al 10 % en solución de NaCl al 0.9% a pH de 7.6 seguido de 250 ml de solución de Clarke (alcohol de 96°: ácido acético glacial en proporción 3:1) (Barrón y cols. 1977). El cerebro fue extraído del cráneo inmediatamente después y se completó su fijación por inmersión en fijador de Clarke al menos durante 7 días. Después se realizaron cortes coronales de 3 mm de diámetro de cada cerebro, que fueron incluidos en parafina para obtener bloques con diferentes porciones del cerebro. De los bloques correspondientes al hipocampo y a la SNr se obtuvieron cortes seriados de 10 μ m de grosor los cuales fueron teñidos con la técnica de Kluver-Barrera con Luxol fast blue-violeta de cresilo (Carson 1980). De cada cerebro se tomaron 5 cortes del hipocampo dorsal localizados entre A3.0 y A5.5, o sea 3.0 a 5.5 mm por delante de la línea interaural de acuerdo al atlas de Snider y Niemer (1961); se examinaron al microscopio óptico, a 400x y en cada corte se llevó al cabo el conteo de las neuronas piramidales del hipocampo en dos regiones vecinas de 450 μ m de extensión en el campo CA1 y en una región de 450 μ m en CA2, en CA3 y en CA4. Únicamente se contaron las neuronas piramidales que mostraban características morfológicas normales y nucléolo visible.

Se obtuvieron los valores promedio del número de neuronas observadas en cada campo en los 5 diferentes cortes del hipocampo de cada gata en cada grupo experimental.

De la misma manera de como se procedió para el muestreo en el hipocampo, de cada cerebro se tomaron 5 cortes del bloque en el cual se encontró la sustancia nigra pars reticulata. La parte que se analizó de la SNr se localizó entre A4.0 y A6.0 o sea 4.0 a 6.0 mm por delante de la línea interaural ya que de acuerdo con el estudio realizado por Miyamoto y Jinnai (1994) y Poirier y cols. (1983), estas regiones presentan una mayor población de neuronas de tipo reticular. Los cortes se examinaron con microscopio óptico, con un aumento de 312x, en cada corte únicamente se contaron las neuronas que mostraban características morfológicas normales, esto es con somas de

forma multipolar, triangular u ovoide, con grandes cantidades de sustancia de Nissl, formando los característicos cuerpos de Nissl que le dan la típica apariencia "atigrada". Las neuronas de tipo reticular de tamaño grande miden en promedio $25.3 \pm 6.1 \mu\text{m}$ en su eje mayor y las de tamaño mediano miden en promedio $14.2 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (Poirier y cols. 1983). Se contaron ambos tipos neuronales en campos de $450 \mu\text{m}$ de diámetro.

Se obtuvieron los valores promedio del número de neuronas observadas en cada campo en los 5 diferentes cortes de la SNr de cada gata en cada grupo experimental.

Análisis estadístico

Se analizaron los valores de pH, gases en sangre, glucosa, frecuencia cardíaca y PAM obtenidos antes del PCR y se compararon con los obtenidos en cada animal de cada grupo experimental durante las 6 h pos-isquemia, mediante un análisis de varianza y pruebas de Duncan (Daniel 1991).

Se analizaron los porcentajes promedio de las frecuencias de descarga de la AMN de las diferentes estructuras cerebrales en el estado conductual de alerta por grupo mediante un análisis de varianza de mediciones repetidas (Daniel 1991) para la comparación de los valores obtenidos del grupo I con respecto a los del grupo II y grupo III. Este análisis fue seguido por pruebas "t" de Student (Daniel 1991), para comparar en cada grupo experimental, las frecuencias promedio obtenidas en el registro control con las obtenidas en los días siguientes bajo tratamiento, en las horas y los días posteriores al episodio de isquemia-anoxia cerebral global aguda o a las maniobras experimentales sham, aún bajo tratamiento y al suspender éste.

Se compararon en cada día posterior al PCR los puntajes de deficiencia neurológica de las gatas que estuvieron bajo tratamiento con vehículo con las que fueron tratadas con P₄. También se compararon los puntajes obtenidos por los sujetos de cada uno de estos grupos con los del grupo sham. Para este análisis se utilizó la prueba "U" de Mann-Whitney (Daniel, 1991).

Se utilizó un análisis de varianza de dos factores seguido de la prueba "t" no pareada (Daniel, 1991) para comparar los valores promedio del número de neuronas piramidales observadas en los sectores CA1 a CA4 del hipocampo, así como de las neuronas de tamaño mediano y grande de la sustancia nigra pars reticulata de los diferentes grupos experimentales.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las manipulaciones experimentales de los animales están de acuerdo con los lineamientos indicados por la División de Investigación Biomédica del IMSS, tratando de evitar el sufrimiento innecesario de los animales en el protocolo de investigación.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Cardiología del CMN Siglo XXI del IMSS con el número 112395/43 y por la Comisión de Investigación Científica de Investigación Médica, IMSS con el número 96-715-0001.

RESULTADOS

El peso corporal de los animales incluidos en el estudio varió entre 3.0 y 3.5 Kg durante todo el estudio y no difirió significativamente entre los tres grupos.

Los valores de la concentración de P_4 (media \pm DE) en el suero de las gatas al día previo al inicio del tratamiento con P_4 o con vehículo fueron: 2.1 ± 0.7 ng/ml, en el grupo I; 2.3 ± 0.6 ng/ml en el grupo II y 1.9 ± 0.8 ng/ml en el grupo III, sin diferencias significativas entre grupos. A partir de estos valores iniciales, las concentraciones de P_4 en el suero de las gatas de los grupos que recibieron vehículo se mantuvieron similares durante el período de 7 días de tratamiento previo a las maniobras "sham" o al episodio de isquemia; entre 1.5 ± 0.3 ng/ml y 2.5 ± 0.6 ng/ml en el grupo I y entre 1.7 ± 0.4 y 2.8 ± 0.7 ng/ml en el grupo II. En cambio la administración diaria de P_4 dio como resultado un incremento de la concentración de P_4 en el suero de las gatas del grupo III, con valores de 114.1 ± 24.7 ng/ml al segundo día y con valores de 126.2 ± 47.2 y 181.5 ± 67.2 ng/ml en los días 4 y 7 después del inicio del tratamiento.

Los valores de la concentración de gases, exceso de base, glucosa en sangre, obtenidos inmediatamente antes y en las horas siguientes al episodio de isquemia o las maniobras "sham", se encuentran incluidos en la Tabla 1. Estos valores se encontraron dentro de límites fisiológicos en todas las gatas antes del episodio de isquemia o de las maniobras sham y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

El paso de corriente alterna al través del electrodo intraauricular provocó de manera inmediata fibrilación ventricular y caída súbita de la PAM por debajo de 10 mmHg en los animales de los grupos II y III. La detención de la actividad mecánica del corazón y la supresión de la ventilación pulmonar se mantuvieron durante 15 min. y a partir de entonces las maniobras de reanimación requirieron entre 2.10 a 3.35 min. y entre 2.00 a 3.60 min. en el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con P_4 respectivamente. Usualmente fueron necesarias 2 ó 3 descargas de DC con el desfibrilador durante las maniobras de reanimación para restaurar el ritmo sinusal. El

tiempo empleado en las maniobras de reanimación no mostró diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos experimentales.

Se observó una disminución significativa pero transitoria del pH y de los valores del exceso de base ($P < 0.01$) y un incremento significativo de los valores de PaCO_2 ($p < 0.05$), 10 y 30 minutos después de terminadas las maniobras de reanimación tanto en las gatas tratadas con vehículo como en las tratadas con progesterona, en comparación con los valores que presentaron antes del PCR y en comparación con los valores del grupo "sham". Sin embargo, estos valores fueron rápidamente corregidos ajustando la frecuencia del respirador y mediante la administración de bicarbonato de sodio de modo que los valores de estos parámetros obtenidos en determinaciones subsecuentes, de una a seis horas después del PCR no presentaron diferencias significativas con los obtenidos antes del PCR. En ambos grupos experimentales se observó un incremento transitorio y significativo de los valores de PaO_2 ($p < 0.05$) debido a la ventilación mecánica asistida con $\text{FiO}_2 = 1$ durante las horas posteriores al PCR (Tabla 1).

En los sujetos sometidos a isquemia, las concentraciones de glucosa en sangre se incrementaron significativamente a partir de los 10 min. después de las maniobras de reanimación; en este tiempo, en el grupo tratado con vehículo la concentración de glucosa fue de 208 ± 48 mg/dl y en los sujetos tratados con P_4 fue de 265 ± 66 mg/dl. La glucosa sanguínea permaneció elevada durante todo el período pos-isquemia (entre 185 ± 92 y 230 ± 34 mg/dl en el grupo tratado con vehículo y entre 176 ± 39 y 210 ± 58 mg/dl en el grupo tratado con P_4); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ambos grupos cuando éstos fueron comparados a tiempos específicos después del PCR. En el grupo sometido a maniobras sham, las concentraciones de glucosa sanguínea se encontraron entre 130 ± 10 y 215 ± 49 mg/dl durante el período de 6 h siguiente al episodio de isquemia, que aún siendo menores a los presentados

Tabla 1: Valores (media \pm DE) de pH, EB (mEq/lit), PaCO₂ (mmHg), PaO₂ (mmHg), Glucosa (mg/dl), FC (latidos por min) y PAM (mmHg) de las gatas tratadas con vehiculo y sometidas a maniobras simuladas (Sham) y de las gatas sometidas a isquemia y tratadas con vehiculo (Isq+Veh) o con P₄ (Isq+P₄) antes del período de isquemia o de maniobras sham (valor control) y durante las 6 h siguientes a éste.

		control	10 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h
pH	Sham	7.36 \pm 0.02	7.34 \pm 0.01	7.36 \pm 0.15	7.40 \pm 0.02	7.35 \pm 0.15	7.35 \pm 0.15	7.40 \pm 0.15
	Isq+Veh	7.38 \pm 0.08	7.20 \pm 0.1**	7.15 \pm 0.3**	7.24 \pm 0.13	7.37 \pm 0.10	7.44 \pm 0.20	7.40 \pm 0.04
	Isq+P ₄	7.36 \pm 0.08	7.24 \pm 0.2**	7.17 \pm 0.1**	7.26 \pm 0.13	7.37 \pm 0.11	7.42 \pm 0.10	7.37 \pm 0.13
EB	Sham	3.0 \pm 0.01	-14.6 \pm 0.2	-7.05 \pm 0.63	-13 \pm 0.63	-7.05 \pm 0.63	-7.05 \pm 0.63	12.1 \pm 0.63
	Isq+Veh	-11 \pm 2.0	-13 \pm 4.0**	-22 \pm 4.0**	-14 \pm 5.0	-10 \pm 4.0	-8.0 \pm 2.0	9.0 \pm 1.0
	Isq+P ₄	-12 \pm 3.0	-13 \pm 7.0**	-17 \pm 3.0**	15 \pm 3.0	-10 \pm 2.0	-8 \pm 2.0	-9 \pm 2.0
PaCO ₂	Sham	36 \pm 2.0	11 \pm 9.0	8.0 \pm 0.7	12 \pm 7.0	25 \pm 8.0	25 \pm 8.0	7.5 \pm 8.0
	Isq+Veh	21 \pm 6.0	40 \pm 14.0*	34 \pm 13.0*	26 \pm 11.0	24 \pm 13.0	20 \pm 11.0	21 \pm 5.0
	Isq+P ₄	21 \pm 8.5	30 \pm 10	29 \pm 7.4	23 \pm 8.0	22 \pm 6.0	22 \pm 8.0	28 \pm 12.0
PaO ₂	Sham	84 \pm 3.0	115 \pm 25	75 \pm 7.0	116 \pm 47	83 \pm 47	82.5 \pm 47	116 \pm 47
	Isq+Veh	120 \pm 55	144 \pm 81	200 \pm 80*	270 \pm 80*	310 \pm 54*	296 \pm 71*	353 \pm 22*
	Isq+P ₄	124 \pm 64	197 \pm 7.0	216 \pm 109*	231 \pm 95*	257 \pm 83*	268 \pm 72*	357 \pm 81*
Glucosa	Sham	130 \pm 10	130 \pm 10	150 \pm 25	215 \pm 49	200 \pm 71	165 \pm 21	165 \pm 21
	Isq+Veh	163 \pm 31	208 \pm 48	230 \pm 34	226 \pm 49	208 \pm 48	192 \pm 56	185 \pm 92
	Isq+P ₄	172 \pm 54	265 \pm 66	210 \pm 58	198 \pm 61	176 \pm 39	189 \pm 33	208 \pm 38
FC	Sham	123 \pm 4.0	163 \pm 5.0	145 \pm 5.0	140 \pm 10	120 \pm 10	125 \pm 18	140 \pm 18
	Isq+Veh	136 \pm 13	133 \pm 32	149 \pm 17	145 \pm 32	152 \pm 13	135 \pm 34	100 \pm 14
	Isq+P ₄	124 \pm 21	132 \pm 8.0	121 \pm 15	126 \pm 18	131 \pm 19	131 \pm 20	129 \pm 23
PAM	Sham	95 \pm 5.0	140 \pm 14	130 \pm 14	130 \pm 00	130 \pm 14	125 \pm 7.0	120 \pm 7.0
	Isq+Veh	144 \pm 13	160 \pm 28	119 \pm 34	129 \pm 27	136 \pm 34	119 \pm 36	107 \pm 42
	Isq+P ₄	146 \pm 25	134 \pm 24	109 \pm 21	114 \pm 32	116 \pm 21	123 \pm 21	126 \pm 25

*p<0.05, **p<0.01 en comparación con el valor control.

por los grupos II y III a los 10 y 30 min. después del PCR, no presentaron diferencias significativas entre grupos en las horas siguientes al PCR (Tabla 1).

Los valores de frecuencia cardíaca en las horas posteriores al PCR se mantuvieron entre 100 ± 14 y 152 ± 13 , y entre 121 ± 15 y 132 ± 8 latidos/min. en los sujetos sometidos a isquemia y tratados con vehículo o tratados con P₄ respectivamente encontrándose dentro de límites fisiológicos a partir de las 2 horas pos-PCR (Tabla 1). El grupo sometido a maniobras "sham" presentó valores de frecuencia cardíaca entre 123 ± 4 y 163 ± 5 latidos/min. durante las horas siguientes al PCR. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Los valores de PAM se mantuvieron entre 107 ± 42 y 160 ± 28 mmHg y entre 109 ± 21 y 146 ± 25 mmHg en el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con P₄ respectivamente, durante las siguientes horas del período experimental, con los valores mayores a los 10 min. después del PCR. No se encontraron diferencias significativas en los valores de la PAM entre los dos grupos sometidos a isquemia. El grupo sham mostró valores de PAM entre 120 ± 7 y 140 ± 14 mmHg durante las 6 h siguientes a las maniobras sham, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 1).

La temperatura rectal se mantuvo entre 37°C y 37.5°C en todas las gatas antes y durante las 6 h siguientes al episodio de isquemia.

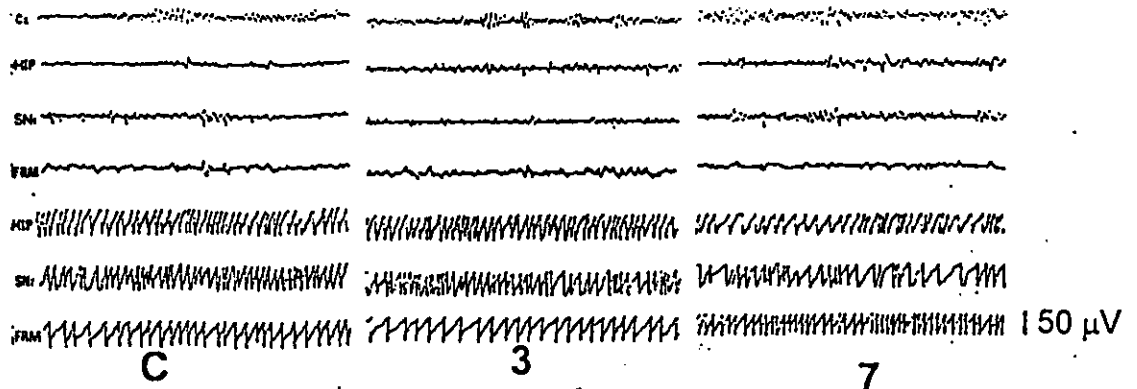
La pérdida sanguínea en cada una de las gatas sometidas a las maniobras sham, así como en las sometidas al PCR fue entre 15 a 20 ml incluyendo las maniobras quirúrgicas previas al episodio de isquemia y las 6 h siguientes a este fenómeno.

Análisis de la actividad eléctrica cerebral

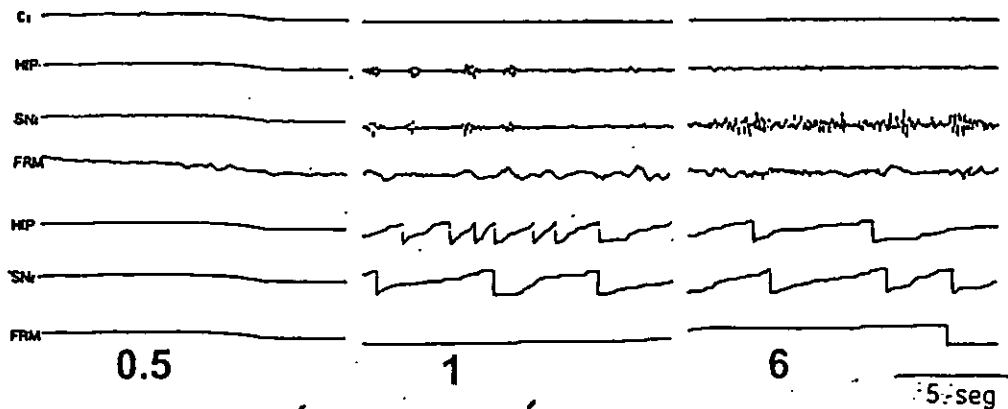
Electroencefalograma

En las Figuras 1 y 2 se muestran los trazos del electroencefalograma (EEG) de la corteza parietal (Cx), el EEG y las escaleras generadas por la actividad multineuronal

DÍAS ANTES DEL PCR



HORAS DESPUÉS DEL PCR



DÍAS DESPUÉS DEL PCR

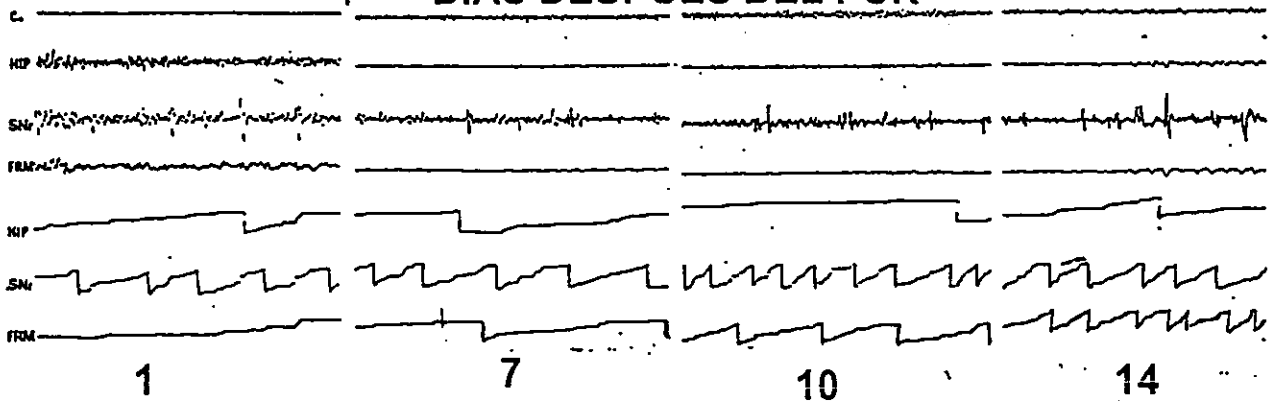


Fig. 1. Trazos poligráficos correspondientes al registro del electroencefalograma (EEG) de la corteza parietal (Cx) y del EEG y de la actividad multilinear (AMN) del hipocampo (HIP), de la pars reticulata de la sustancia nigra (SNr) y de la formación reticular mesencefálica (FRM) obtenidos en una gata sometida a isquemia y tratada con vehículo, en los días anteriores al paro cardiorrespiratorio (PCR), en las horas y en los días posteriores al PCR.

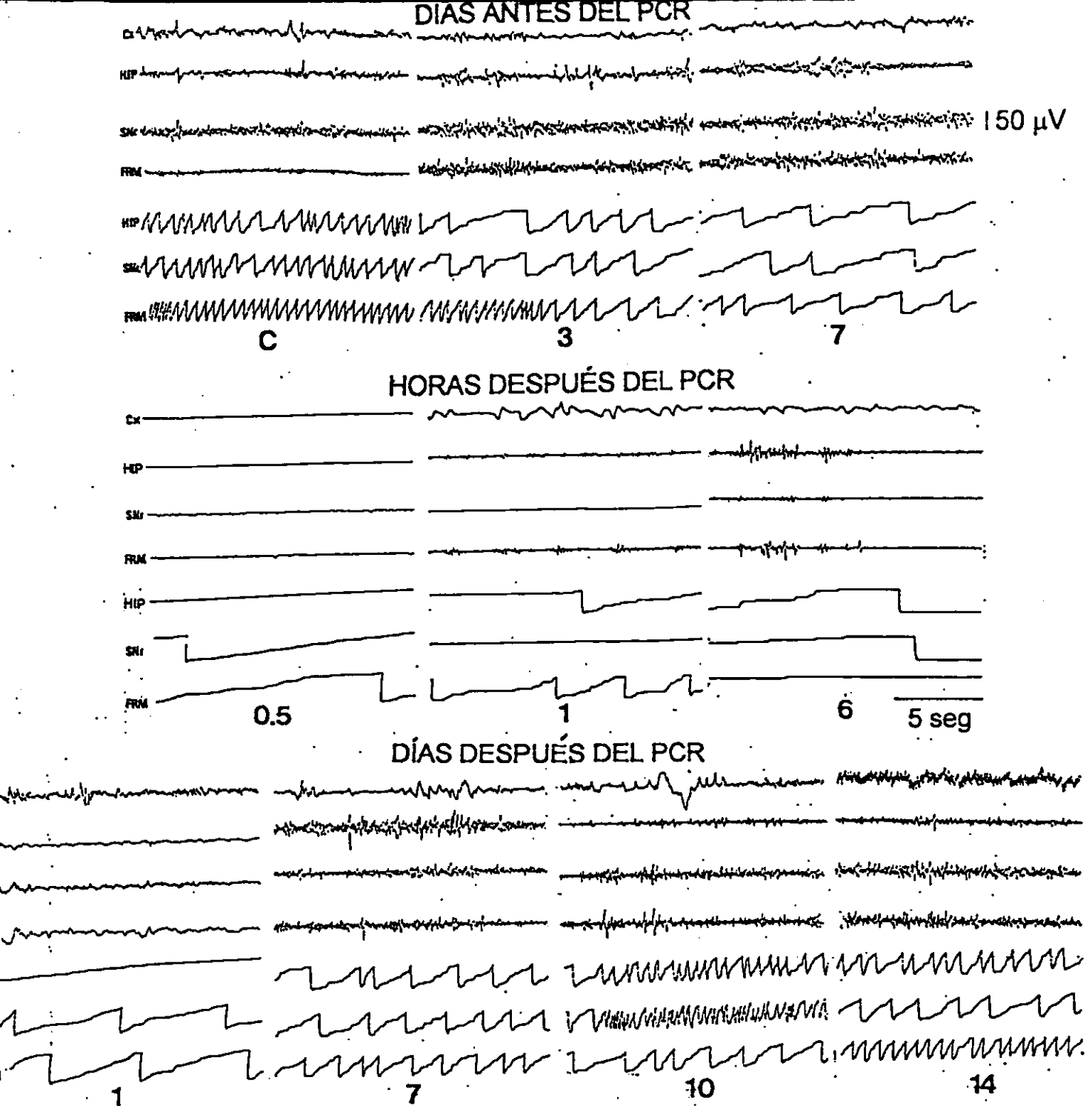


Fig. 2. Trazos poligráficos correspondientes al registro del electroencefalograma (EEG) de la corteza parietal (Cx) y del EEG y de la actividad multineuronal (AMN) del hipocampo (HIP), 0 la pars reticulata de la sustancia nigra (SNr) y de la formación reticular mesencefálica (FRM) obtenidos en un gato sometido a isquemia y tratado con progesterona, en los días anteriores al paro cardiorrespiratorio (PCR), en las horas y en los días posteriores al PCR, aún bajo tratamiento con progesterona (7 días) y al suspender éste (hasta el día 14).

(AMN) de las estructuras subcorticales: hipocampo (HIP), sustancia nigra pars reticulata (SNr) y de la formación reticular mesencefálica (FRM) en un sujeto del grupo sometido a isquemia y tratado con el vehículo (Figura 1) y en un sujeto sometido a isquemia y tratado con progesterona (Figura 2).

Ambas figuras muestran los cambios que ocurrieron en el electroencefalograma y en el número de escaleras generadas por la AMN como consecuencia de la administración de vehículo o de progesterona los 7 días previos y los 7 días siguientes al episodio de isquemia; así como los cambios provocados por el período de isquemia de 17-19 min. de duración, en los fenómenos electrográficos referidos durante las horas y en los días siguientes al episodio de isquemia.

El EEG de los animales del grupo sham presentó las mismas características observadas en el registro control durante todos los días de registro con predominio de actividad beta (> 13 Hz) en la condición de atento quieto.

Las características del EEG de las gatas bajo tratamiento con el vehículo de la P₄, los días previos al PCR fueron similares a las observadas en el registro de control antes de iniciar el tratamiento con el vehículo y a las observadas en el grupo "sham" en los días previos al PCR. A partir del PCR la actividad electroencefalográfica de la corteza parietal y de las estructuras subcorticales estuvo ausente entre 30 min. y 1 h, para dar lugar a continuación a la recuperación progresiva del EEG con la presencia de trenes de ondas de 4 a 9 Hz con intervalos de trazo isoelectrico, dando la imagen electroencefalográfica de "actividad - supresión", ondas lentas tipo delta (0.5 - 4 Hz), espigas aisladas y grupos de ondas rápidas (10 - 14 Hz), mezcladas con una actividad de base con voltaje progresivamente creciente.

En los días posteriores al PCR se observó una recuperación gradual de la actividad rápida del EEG de la corteza y las estructuras subcorticales con persistencia de espigas de tipo epileptoide y actividad lenta, aun evidentes 14 días después del episodio de isquemia.

El EEG de la corteza parietal mostró la presencia de grupos de ondas en forma de husos con frecuencia de 10-14 Hz, en los animales tratados con P₄ durante 7 días previos al episodio de isquemia, más abundantes en los últimos días de este período (Fig. 2).

En este grupo, el EEG de la corteza parietal y de las estructuras subcorticales estuvo ausente al término del período de isquemia cerebral hasta aproximadamente 1 h después del PCR, mostró una recuperación gradual y progresiva de su actividad de base con el transcurso del tiempo, con características similares en cuanto a la cantidad de ondas lentas, espigas aisladas y trenes de actividad rápida en comparación con los observados en el grupo tratado con vehículo.

En los 7 días posteriores al PCR y aún bajo el tratamiento con P₄, además de la recuperación del EEG con características similares al control obtenido antes de iniciar el tratamiento previo al episodio de isquemia, se observó la presencia de trenes de ondas sincrónicas en forma de husos con frecuencia de 10 - 14 Hz; y espigas aisladas de manera esporádica.

Actividad multineuronal

La Figura 3 ilustra los cambios de la actividad multineuronal, expresados como el porcentaje de la frecuencia de descarga (número de descargas/segundo) de la AMN registradas en cada una de las tres estructuras subcorticales antes de iniciar los tratamientos y los procedimientos experimentales, durante el estado conductual atento-quieto (100%).

En esta figura se observa que las frecuencias de descarga de la AMN fueron similares al control en el hipocampo (83 % a 114% del valor control), la sustancia nigra pars reticulata (63 % a 102 % del valor control) la formación reticular mesencefálica (62 % a 103 % del valor control) en el grupo "sham" durante el período de 7 días previo a las maniobras "sham" correspondientes al episodio e isquemia y hasta 14 días después

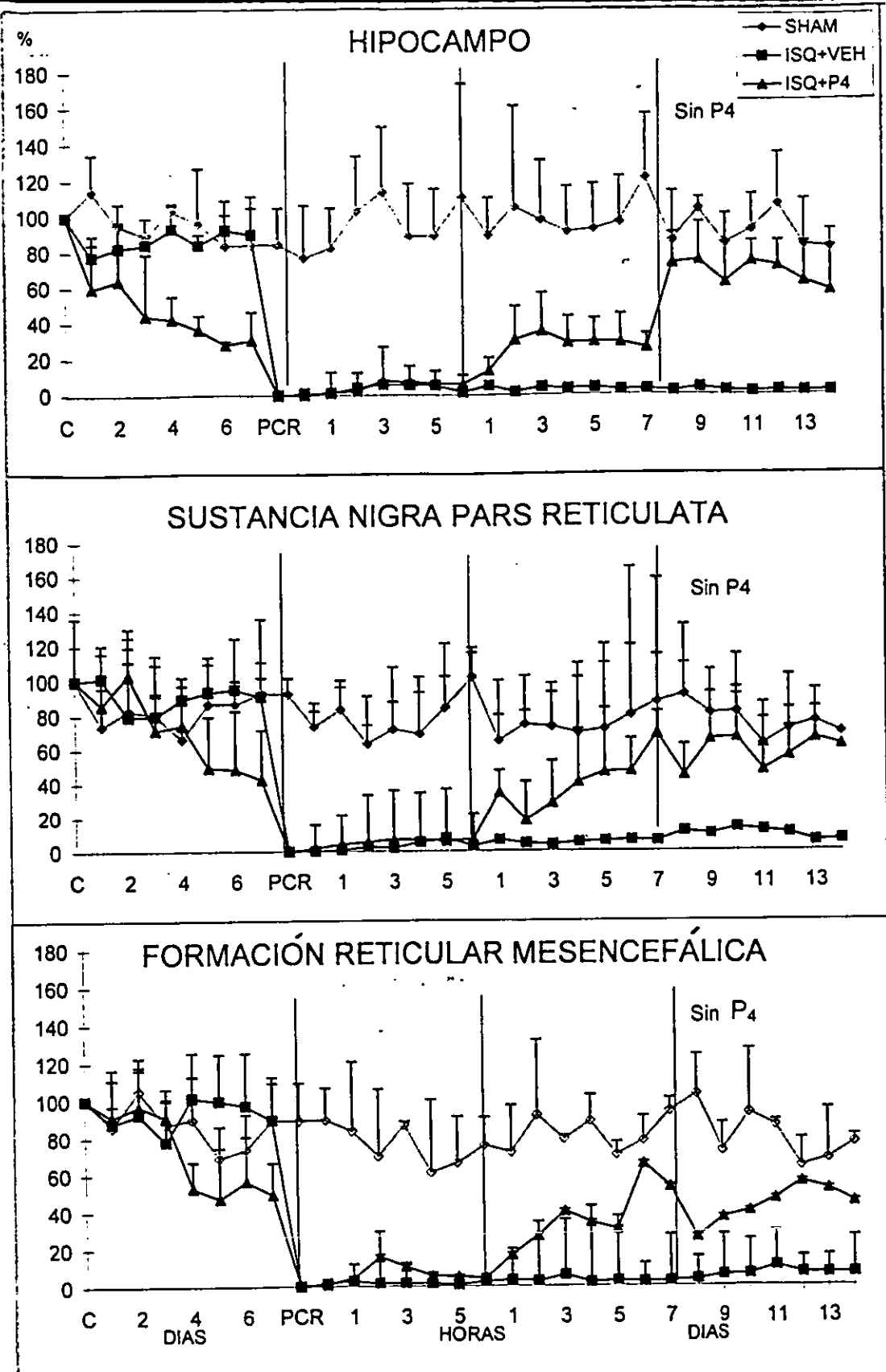


Fig. 3. Valores promedio de la frecuencia de descarga de la AMN de las diferentes estructuras subcorticales en el grupo sham (SHAM), en los grupos sometidos a ischemia y tratado con vehiculo (ISQ+VEH) o tratado con progesterona (ISQ+P4). Puede observarse la reducción significativa de la AMN en los sujetos bajo tratamiento con P4 en los días anteriores al PCR, su supresión provocada por el periodo de ischemia y su recuperación significativa en los días posteriores al PCR en comparación con sus valores en el registro tomado como control (C).

de esta condición experimental, con variaciones relativamente grandes entre los diferentes sujetos, así como en los diferentes días de registro (Fig. 3).

Los valores de frecuencia de descarga de la AMN registrados en el hipocampo (78 % a 94 % del valor control), la substancia nigra pars reticulata (75 % a 101 % del valor control) y la formación reticular mesencefálica (88 % a 101 % del valor control) en el grupo tratado con vehículo fueron similares a los del grupo sham durante los primeros 7 días de registro antes del episodio de isquemia (Fig. 3). En cambio, durante este período, en el grupo tratado con progesterona se observó una disminución progresiva de la AMN en las estructuras subcorticales a partir del inicio del tratamiento, siendo esta disminución estadísticamente significativa a partir del cuarto día en el hipocampo (43% del control; $p < 0.001$) y la formación reticular mesencefálica (53 % del control; $p < 0.05$); a partir del quinto día en la substancia nigra pars reticulata (50 % del control; $p < 0.05$) con respecto a los valores de control (Fig. 3) y en comparación con el grupo tratado con vehículo o el grupo "sham".

El paro cardiorrespiratorio provocó la supresión de la AMN en las estructuras subcorticales registradas con una recuperación de la AMN no mayor al 10 % de la frecuencia de descarga en condiciones de control en las 6 h siguientes al episodio de isquemia (Fig. 3).

En los 14 días siguientes al PCR, los valores de frecuencia de descarga de la AMN del hipocampo, la substancia nigra pars reticulata y la formación reticular mesencefálica de las gatas del grupo II tratadas con vehículo se mantuvieron por debajo del 10 % del valor control ($p < 0.001$). En cambio, se observó una recuperación progresiva de la AMN de estas estructuras en los animales tratados con progesterona, hasta valores del 35 % del control en el hipocampo, 63 % del control en la substancia nigra pars reticulata y 66 % del control en la formación reticular mesencefálica; todos ellos significativamente menores que los del grupo sham ($p < 0.001$, $p < 0.05$ y $p < 0.05$ respectivamente), pero significativamente mayores ($p < 0.001$) que los del grupo tratado

con vehículo al séptimo día pos-isquemia. Al discontinuar el tratamiento con P₄ estos valores aumentaron en el hipocampo hasta 76 % del control; en la sustancia nigra pars reticulata hasta 67 % del control a partir del noveno día pos-isquemia, sin modificaciones en la formación reticular mesencefálica (Fig. 3).

Deficiencia neurológica

Los puntajes de la deficiencia neurológica analizada mediante la escala de Todd y cols. (1982) en los animales del grupo tratado con vehículo y del grupo tratado con P₄ y expuestos a la isquemia cerebral global aguda, se ilustran en la Figura 4. Puede observarse que a partir de puntajes de deficiencia neurológica entre 58 y 81 puntos en los animales tratados con vehículo y de 23 a 49 puntos en los tratados con P₄, al primer día pos-isquemia la magnitud de la deficiencia neurológica tendió a reducirse con el transcurso del tiempo en ambos grupos; de tal manera que en el grupo tratado con vehículo se encontraron puntajes de deficiencia neurológica entre 12 y 62 al cuarto día y entre 8 y 12 al séptimo día pos-isquemia, mientras que en los animales tratados con P₄, los puntajes de deficiencia neurológica en los mismos días pos-isquemia fueron entre 5 a 12 y entre 1 y 6 respectivamente. A partir del octavo día no hubo reducciones adicionales en estos puntajes. Los altos puntajes de deficiencia neurológica en las gatas tratadas con vehículo en los días posteriores al PCR resultaron de la persistencia del tamaño anormal de la pupila y del deficiente reflejo pupilar a la luz, de la disminución de la percepción facial al dolor, la disminución del reflejo flexor al dolor, la disminución del reflejo de orientación al ruido, así como la falta del reflejo de apoyo. Los puntajes de deficiencia neurológica fueron significativamente menores ($p < 0.05$) en las gatas tratadas con P₄ en los días siguientes al PCR en comparación con las gatas tratadas con vehículo.

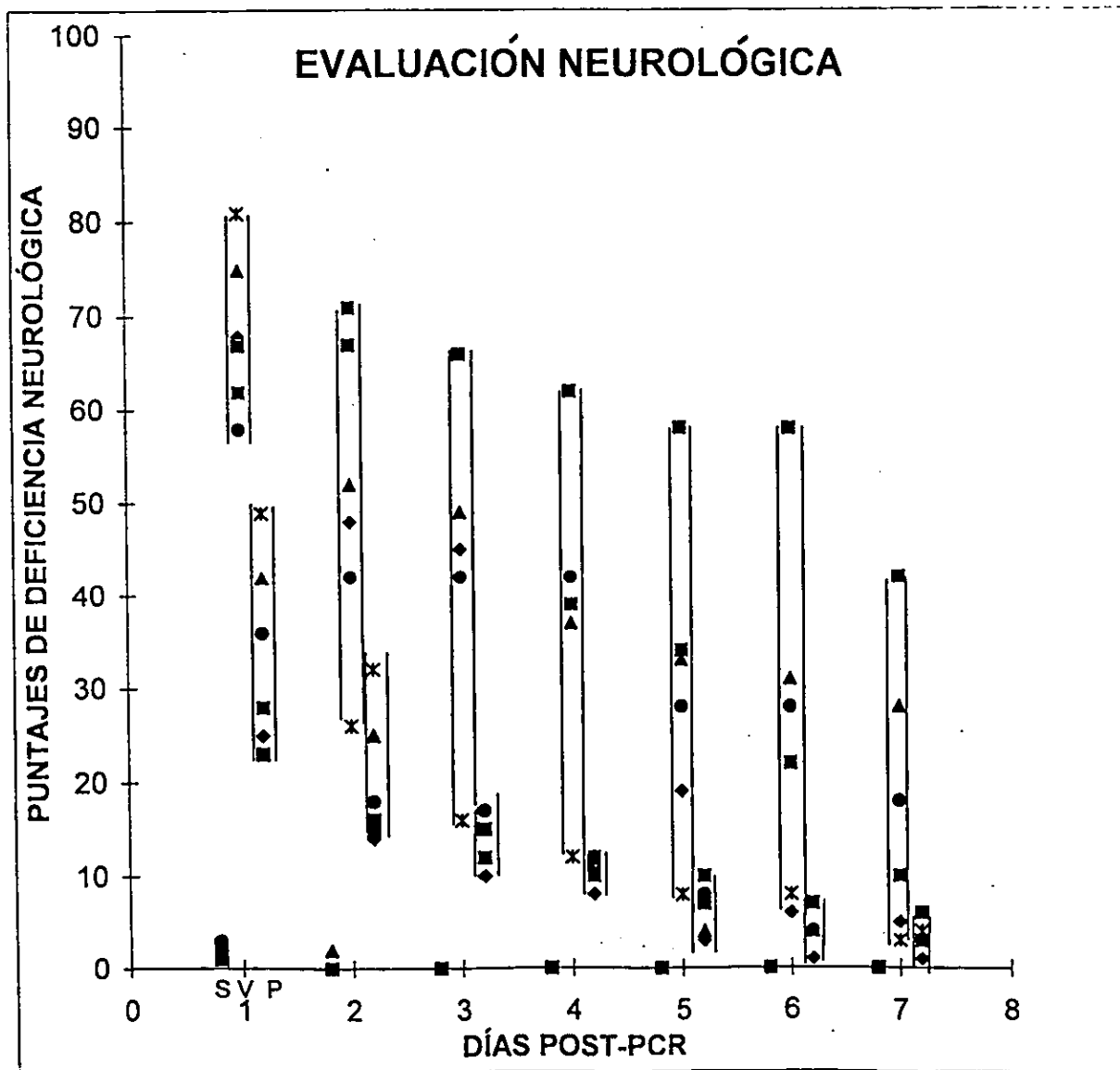


Fig. 4. Puntajes de deficiencias neurológicas, que muestran cada una las gatas durante los 7 días posteriores a las maniobras sham (S), o al PCR bajo tratamiento con vehículo (V) o con progesterona (P). Se pueden observar deficiencias neurológicas significativamente menores en las gatas tratadas con progesterona en los primeros 3 días posteriores al PCR en comparación con los sujetos tratados con vehículo y que estos valores tienden a reducirse en forma similar entre el quinto y el séptimo día después del PCR. Puntaje 0 = condición neurológica normal, puntaje 100= máxima deficiencia neurológica.

Análisis de la población neuronal del hipocampo

La Figura 5 ilustra el aspecto del hipocampo dorsal de una gata intacta, en la cual se puede observar el estrato de células piramidales o Asta de Ammon y la fascia dentada. Se utilizó la nomenclatura de Akai y Yanagihara (1993) para la identificación y delimitación de los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 del estrato piramidal del hipocampo en el gato .

El estrato de las células de la fascia dentada se identificó por la presencia de células granulares típicas, las cuales se observaron densamente empaquetadas y de apariencia normal.

El "hilio" o campo CA4 se identificó como el campo que contenía a las neuronas situadas en la porción final del estrato piramidal, localizado entre las regiones superior e inferior de la fascia dentada del hipocampo dorsal.

El campo CA3 del hipocampo se identificó como una banda de neuronas piramidales que se observó después del hilio y hasta en donde se iniciaba la curvatura del estrato piramidal.

El campo CA2 incluyó las neuronas piramidales de la curvatura hasta una línea vertical imaginaria que inicia en la porción superior de la fascia dentada y se continúa en sentido dorsal hasta el estrato piramidal.

El campo CA1 se identificó desde el final del subcampo CA2 hasta el inicio del subiculum.

En las Figuras 6 y 7 se ilustran las modificaciones de la población neuronal de las regiones CA1 y CA4 del hipocampo, utilizando un corte representativo del hipocampo de una gata del grupo "Sham", de una gata del grupo tratado con vehículo y de una gata del grupo tratado con P₄. En la Figura 6 se muestran imágenes de un corte del campo CA1 y en la Figura 7 del campo CA4. Pueden observarse en el estrato piramidal del hipocampo dorsal del animal del grupo sham abundantes neuronas piramidales de apariencia morfológica normal, con núcleo claro y nucléolo central (Figs.

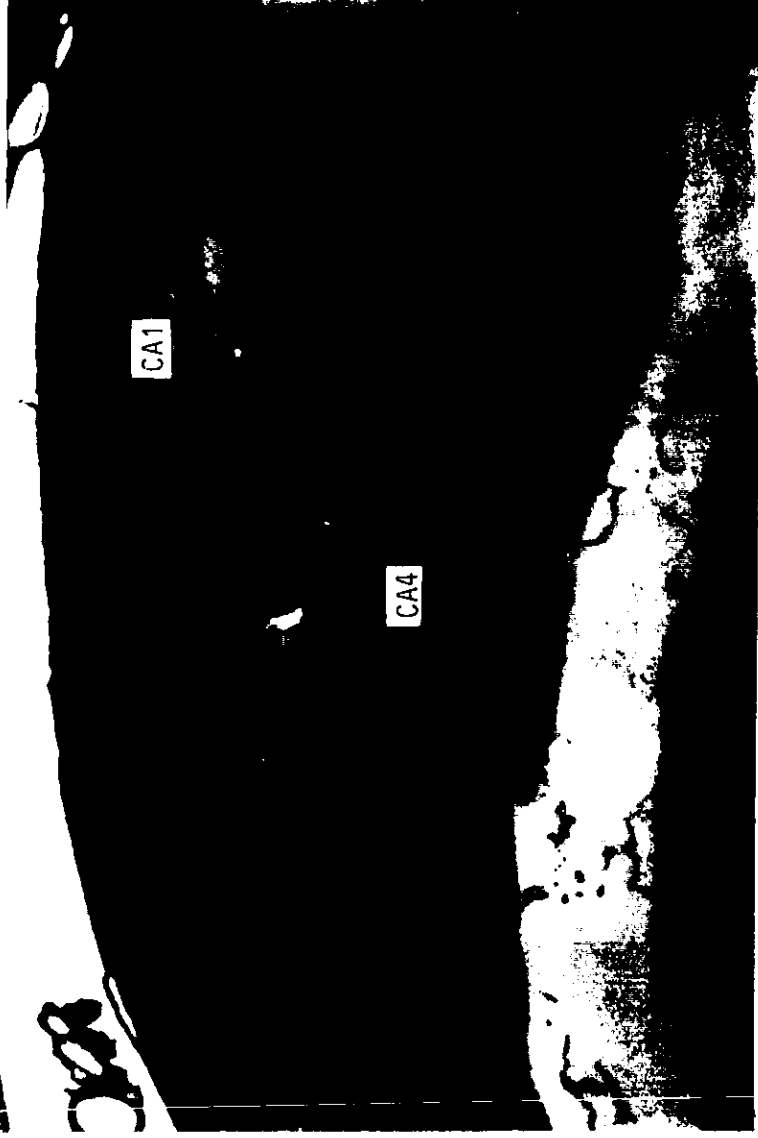


Fig. 5. Corte coronal del cerebro de un gato sometido a maniobras sham, que muestra el hipocampo dorsal con sus diferentes subcampos y el giro dentado.

6 y 7). En la gata del grupo tratado con vehículo y expuesto a la isquemia se observa una gran despoblación del estrato piramidal del hipocampo dorsal; las neuronas piramidales que sobrevivieron al período de isquemia muestran características morfológicas normales y se observa una reacción glial intensa (Figs. 6 y 7).

En la gata del grupo tratado con P₄ y expuesto a la isquemia se observa una disminución notable de la población neuronal, la cual es de menor magnitud que la observada en la gata tratada con vehículo.

Los cerebros de los animales sometidos a isquemia mostraron numerosas células gliales, la reacción glial se observó en todos los campos del hipocampo, siendo más intensa en los cerebros de los sujetos tratados con vehículo en comparación con los sujetos tratados con P₄ y en comparación con los cerebros de sujetos intactos tomados como control. En todos los campos la glia se observó densamente empaquetada (Figs. 6 y 7).

La tabla 2 contiene los valores resultantes del análisis del número de neuronas de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo en los diferentes grupos experimentales, obtenidos 14 días después del episodio de isquemia o de las maniobras "sham".

En el grupo sometido a isquemia y tratado con vehículo se observó una reducción significativa ($p < 0.001$) de la población neuronal y el número de neuronas que sobrevivieron al día 14 después del PCR correspondió únicamente al 15 % en CA1, al 19 % en CA2, al 46 % en CA3 y al 36 % en CA4 con relación a la población neuronal del grupo "sham" y que fue tomada como el 100 %. También se observó una reducción significativa de la población neuronal en el subcampo CA1 ($p < 0.001$) y CA2 ($p < 0.01$). El grupo tratado con progesterona, en el que las neuronas sobrevivientes constituyeron el 51 % y 65 % respectivamente, con relación a la población neuronal del grupo "sham". En este grupo también ocurrió una reducción menor y no significativa de la población neuronal en CA3 y CA4, en donde las neuronas sobrevivientes constituyeron el 79 % y

CA1

SHAM

ISQ+VEH

ISQ+P₄

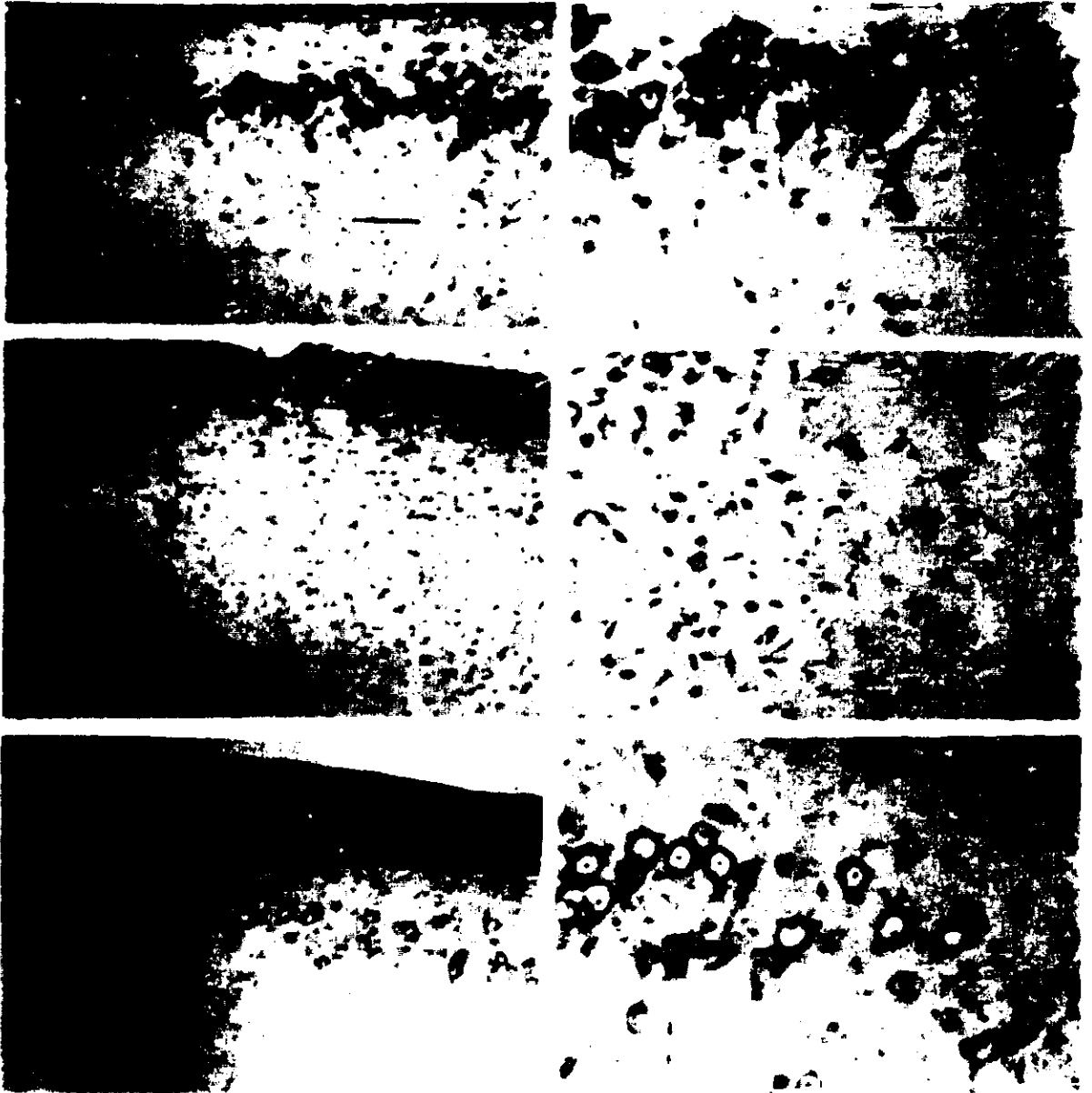


Fig. 6. Cortes coronales representativos del área CA1 del hipocampo de una gata sometida a procedimientos "sham" (SHAM), una sometida a isquemia-anoxia y tratada con vehículo (ISQ+VEH) y una sometida a isquemia y tratada con progesterona (ISQ+P₄). En el lado izquierdo se muestran imágenes a 125x (escala = 1000 μm) y el lado derecho a 312x (escala = 100 μm).

CA4

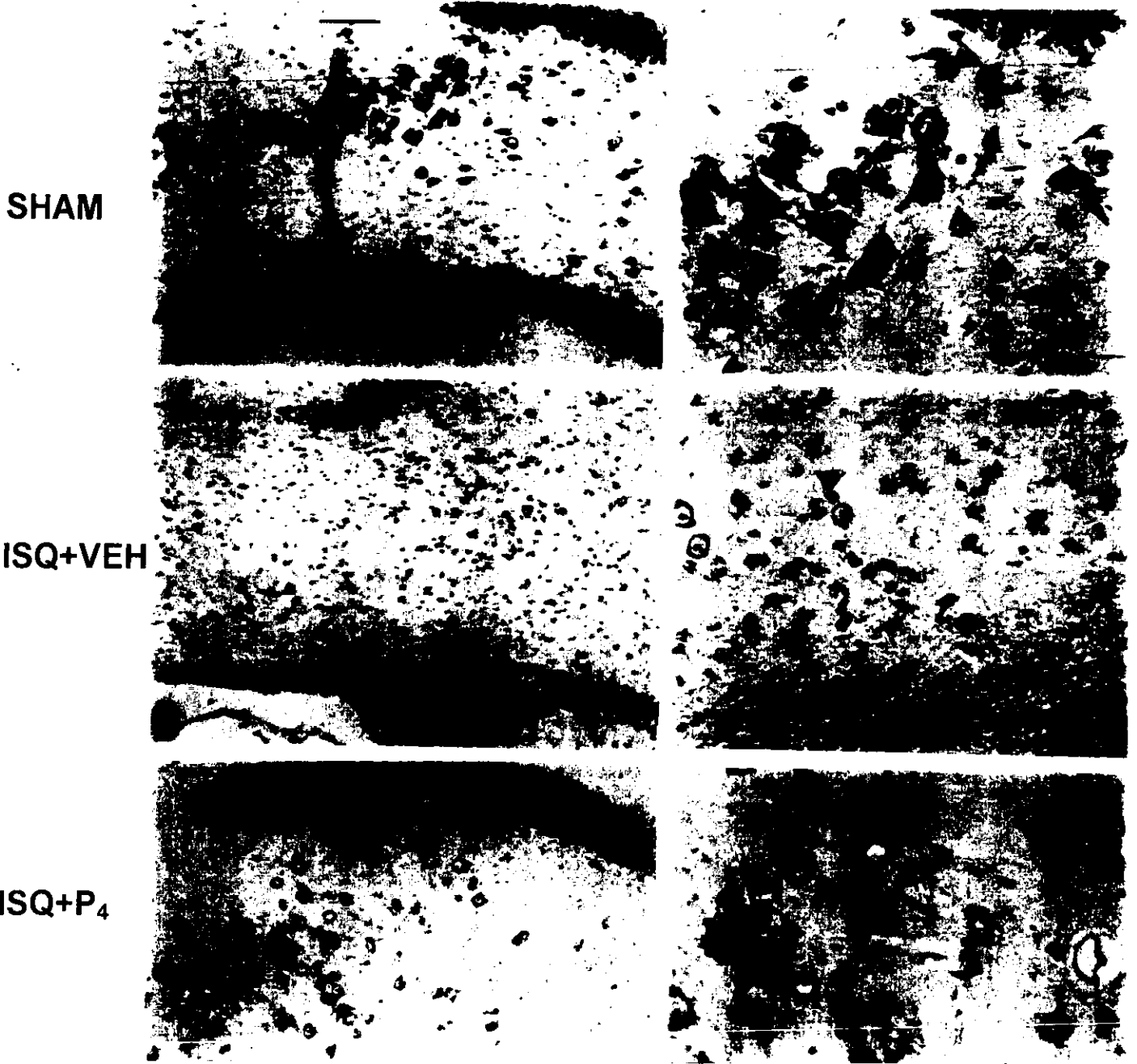


Fig. 7. Cortes coronales representativos del área CA4 del hipocampo de una gata sometida a procedimientos "sham" (SHAM), una sometida a isquemia-anoxia y tratada con vehículo (ISQ+VEH) y una sometida a isquemia y tratada con progesterona (ISQ+P₄). En el lado izquierdo se muestran imágenes a 125x (escala = 1000 μm) y el lado derecho a 312x (escala = 100 μm).

TABLA 2. Número de neuronas piramidales (media \pm DE) contadas en sectores de 450 μ m de los diferentes campos del hipocampo dorsal de las gatas sometidas a maniobras simuladas (Sham) o sometidas a un período de 15 min de isquemia y tratadas con vehículo (Isq + Veh) o con progesterona (Isq + P₄).

	CA1	CA2	CA3	CA4
Sham	19.8 \pm 0.8 (100 %)	34.7 \pm 4.2 (100 %)	19.9 \pm 2.1 (100 %)	22.0 \pm 2.6 (100 %)
Isq + Veh	2.9 \pm 0.4** (15 %)	6.5 \pm 1.5** (19 %)	9.2 \pm 1.6** (43 %)	8.0 \pm 1.5** (36 %)
Isq + P ₄	10.1 \pm 0.6**°° (51 %)	22.7 \pm 2.2*°° (65 %)	15.7 \pm 1.7° (79 %)	17.0 \pm 2.1° (77 %)

*p<0.01; **p< 0.001, comparada con las gatas del grupo sham.

°p<0.01; °°p<0.001, comparada con las gatas sometidas a isquemia y tratadas con vehículo.

77 % respectivamente. Estas poblaciones neuronales del grupo tratado con progesterona fueron significativamente mayores ($p < 0.001$ en CA1 y CA2; $p < 0.01$ en CA3 y CA4) que en el grupo tratado con vehículo (Tabla 2).

Análisis de la población neuronal de la sustancia nigra pars reticulata

En la Figura 8 se muestra una foto representativa de un corte coronal de la sustancia nigra de una gata intacta, en la cual se puede observar la población neuronal de la pars reticulata y de la pars compacta. De acuerdo a los estudios realizados por Poirier y cols. (1983) y por Miyamoto y Jinnai (1994) se delimitó el área que mostró una mayor población de neuronas de tipo reticular en el gato.

Esta área se localizó en la parte dorsal del pedúnculo cerebral y se delimitó desde la región medial de la sustancia nigra hasta la región dorsal y lateral de la misma, tomando como límite lateral el núcleo geniculado lateral (Fig. 8).

En los cortes de los cerebros de las gatas sometidas a maniobras "sham" (Sham) se observaron las neuronas de tamaño mediano ($14.2 \pm 1.6 \mu\text{m}$) y grande ($25 \pm 6.1 \mu\text{m}$) de tipo reticular. Los somas de las neuronas de tamaño mediano son de forma triangular, fusiforme, ovoide o poligonal con un núcleo claro y nucléolo central. Los somas de las neuronas de tamaño grande se observaron de forma triangular o poligonal con cuerpos de Nissl que le dan un aspecto atigrado, con núcleo claro y nucléolo central. Además se observaron cuerpos neuronales sin núcleo ni nucléolo, pero estos somas mostraron el aspecto atigrado característico de las neuronas de tipo reticular (Fig. 9).

Las neuronas de tamaño mediano y grande mostraron características morfológicas normales tanto en los cortes de los cerebros de las gatas tratadas con vehículo como en las tratadas con P_4 y sometidas a isquemia. Se observaron también neuronas deformes con somas muy teñidos, sin núcleo ni nucléolo y con un halo claro alrededor de ellas. En ambos grupos se observa reacción glial abundante (Fig. 9).

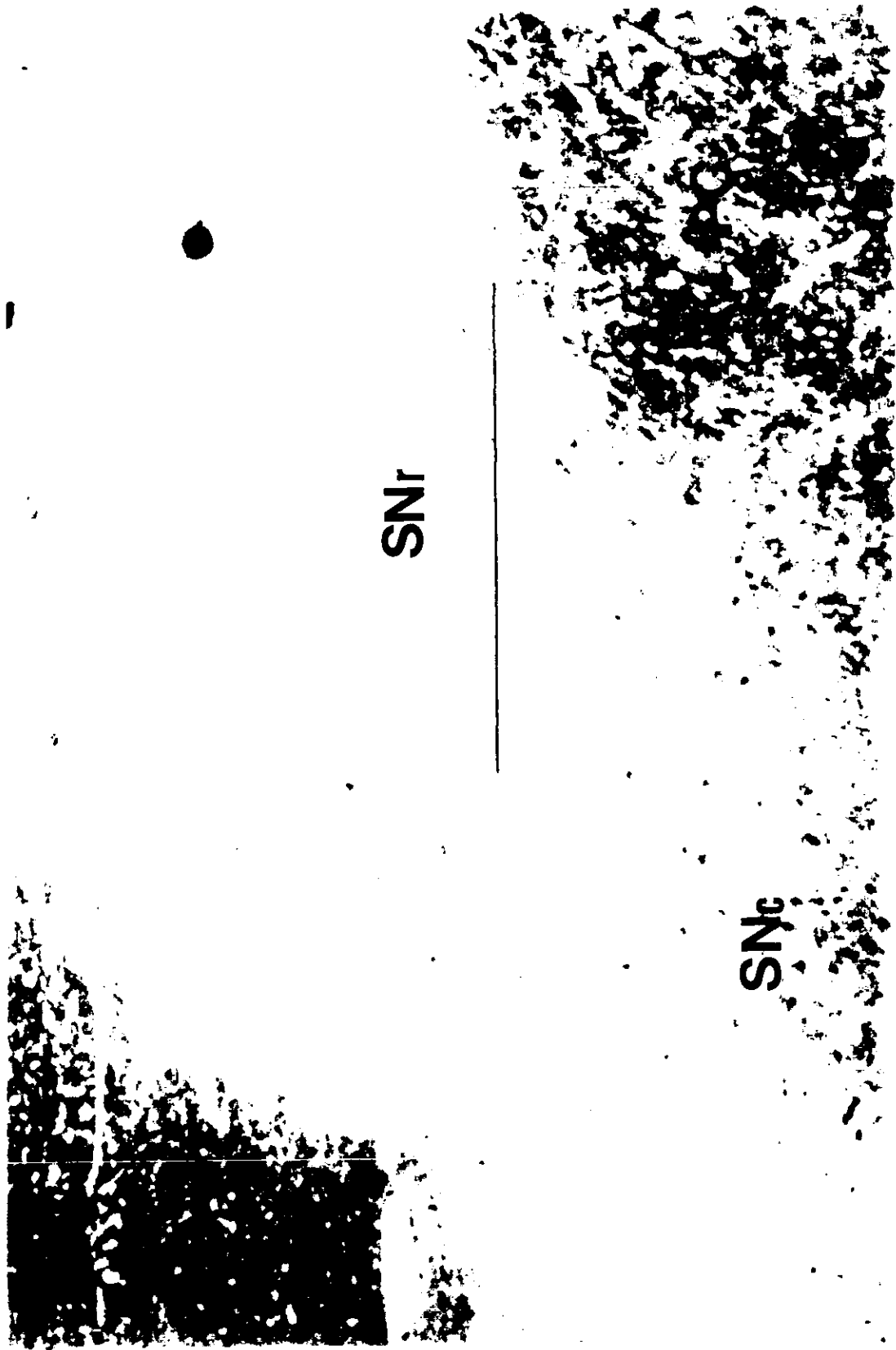
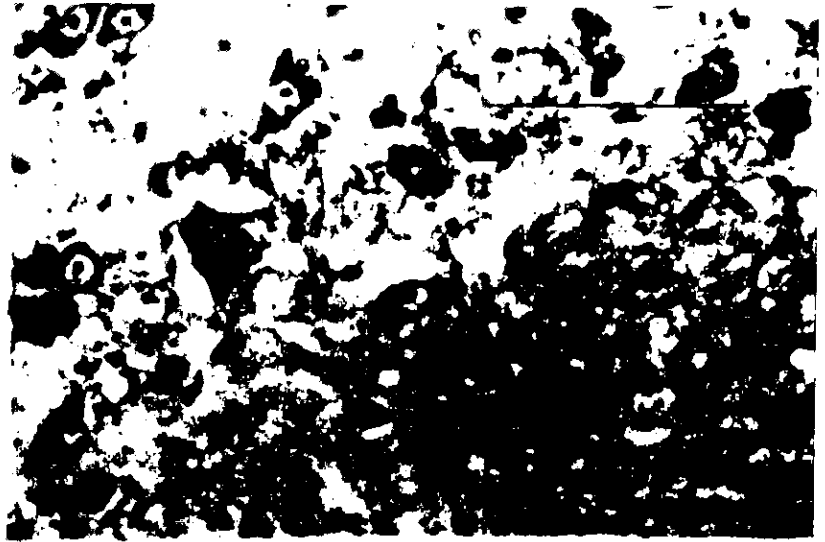
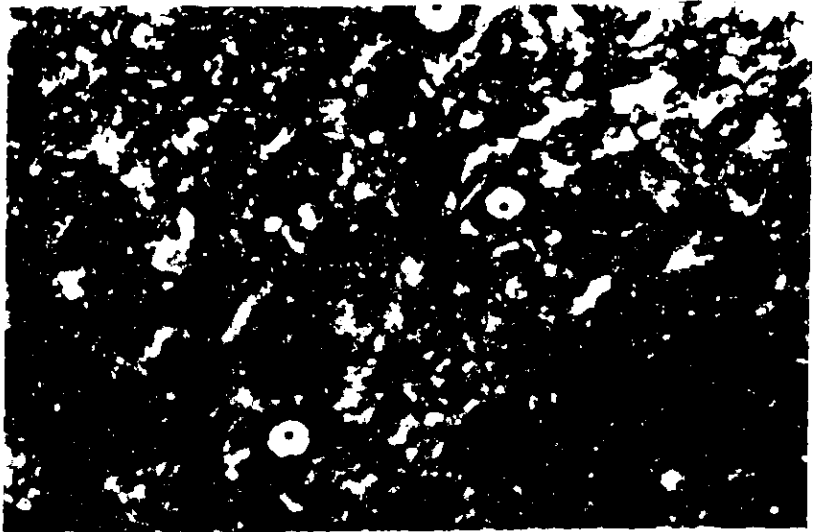


Fig. 8. Corte coronal del cerebro de un gato sometido a maniobras sham, que muestra las neuronas de tipo reticular en la sustancia nigra pars reticulata.

SHAM



ISQ+VEH



ISQ+P4

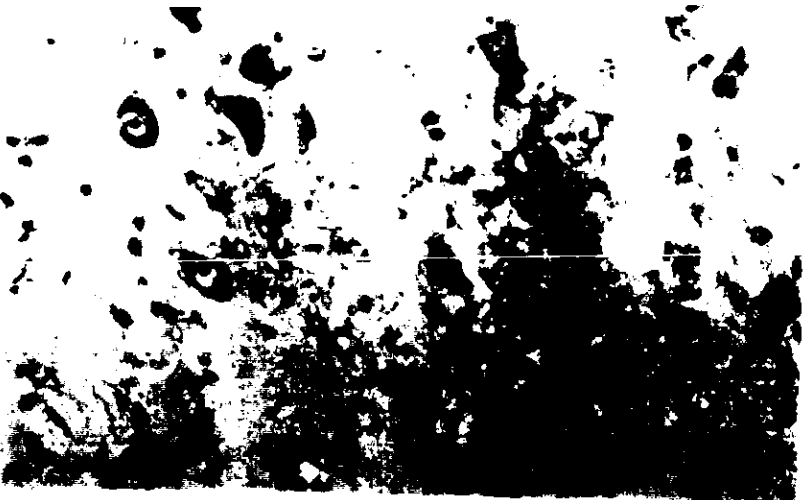


Fig. 5. Histological changes in the hippocampus of rats with ischemia. The rats were divided into three groups: sham (SHAM), ischemia + vehicle (ISQ+VEH), and ischemia + P4 (ISQ+P4). The SHAM group shows normal brain tissue morphology, the ISQ+VEH group shows extensive tissue damage and cellular debris, and the ISQ+P4 group shows a partial recovery of tissue structure compared to the ISQ+VEH group.

TABLA 3. Número (media \pm DE) de neuronas de tamaño grande y mediano contadas en campos de 450 μm en la sustancia nigra pars reticulata de las gatas sometidas a maniobras simuladas (Sham) o sometidas a un período de isquemia y tratadas con vehículo (Isq + Veh) o con progesterona (Isq + P₄).

	NEURONAS DE TAMAÑO GRANDE (25.3 \pm 6.1 μm)	NEURONAS DE TAMAÑO MEDIANO (14.2 \pm 1.6 μm)
Sham	6.71 \pm 2.24 (100 %)	5.31 \pm 5.66 (100 %)
Isq + Veh	6.36 \pm 2.59 (95 %)	3.21 \pm 1.75 (61 %)
Isq + P ₄	4.96 \pm 3.43 (74 %)	3.50 \pm 2.66 (66 %)

Los datos numéricos de la población neuronal de la SNr se muestran en la Tabla 3. La población neuronal de las gatas sometidas a maniobras sham se tomó como el 100%. La población de neuronas de tamaño grande fue el 74 % y el 95 %, en comparación con el grupo sham; en los grupos expuestos a isquemia y tratados con vehículo o con progesterona respectivamente. La población de neuronas de tamaño mediano fue el 61 % y el 66 % en comparación con el grupo sham, en los grupos sometidos a un período de isquemia y tratados con vehículo o tratado con P₄ respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se utilizó un modelo experimental de isquemia cerebral global aguda provocada por paro cardiorrespiratorio. Las variables (PAM, concentraciones de gases en sangre, pH, etc.) capaces de tener influencia sobre la magnitud del daño neuronal inducido por la isquemia se controlaron de manera similar en cada animal experimental de los diferentes grupos. El control de las variables se realizó de la misma manera como otros autores lo han hecho en estudios similares (Todd y cols. 1982, Tateishi y cols. 1989, Kawai y cols. 1992, Cervantes y cols. 1995).

Después de terminadas las maniobras de resucitación, se mantuvo el pH sanguíneo dentro de límites fisiológicos ajustando la frecuencia respiratoria en el caso de acidosis respiratoria o mediante la administración de bicarbonato de sodio cuando la acidosis fue metabólica. Los gases sanguíneos se mantuvieron también dentro de límites fisiológicos al cambiar la administración de oxígeno al 1 por una mezcla de aire. En este modelo experimental es importante mantener controladas todas estas variables puesto que su descontrol puede tener un efecto deletéreo sobre los diferentes elementos celulares del SNC (Todd y cols. 1982, Tateishi y cols. 1989, Kawai y cols. 1992, Cervantes y cols. 1995).

En particular, el incremento de la glucosa sanguínea durante las 6 primeras horas siguientes al episodio de isquemia en el presente estudio fue similar en las gatas tratadas con P₄ (265 mg/dl) y las tratadas con vehículo (230 mg/dl). Se ha sugerido que el incremento en la glucosa sanguínea inmediatamente después del PCR se debe al incremento en la cantidad de catecolaminas circulantes (Tateishi y cols. 1989). Las catecolaminas, en particular la adrenalina, es secretada en grandes cantidades por la médula suprarrenal en respuesta a los estímulos que provoquen estrés y en este caso también fue administrada por vía endovenosa durante las maniobras de resucitación. La adrenalina provoca un incremento en la liberación de glucosa hepática al estimular la glucogenólisis y suspender la glucogénesis (Hernández 1988) .

La PAM se mantuvo por arriba de 90 mmHg en los animales de los diferentes grupos; la PaCO₂ fue controlada luego de la alteración observada durante la primera hora siguiente al episodio de isquemia y las variaciones de la PaO₂ atribuibles a las modificaciones de la FiO₂ fueron similares en los animales del grupo tratado con vehículo y en los animales del grupo tratado con progesterona. De esta manera, se puede asumir que estos factores no contribuyeron de manera importante a las diferencias de los parámetros funcionales e histológicos del sistema nervioso central observadas entre los grupos.

El análisis de algunas características de la actividad eléctrica cerebral se ha considerado como un indicador del estado funcional del SNC (Buchwald 1973) y se ha utilizado en algunos modelos experimentales de isquemia cerebral (Todd y cols. 1982, Tateishi y cols. 1989, Cervantes y cols. 1989, Contreras 1994, Cervantes y cols. 1995) para evaluar las alteraciones funcionales inducidas por la isquemia.

Los cambios registrados en el electroencefalograma (EEG) después del PCR y en los días posteriores al mismo, coinciden con lo ya descrito por otros autores, como son: el aplanamiento y la "actividad-supresión" que se observa inmediatamente después del período de isquemia, la aparición de espigas de tipo epileptoide y la aparición de las ondas delta. En las horas y en los días posteriores a la isquemia se observa una recuperación de la actividad beta y disminución de las ondas delta y actividad de tipo epileptoide (Winters y cols. 1967, Todd y cols. 1982, Van Huffelen y cols. 1984, Cervantes y cols. 1989, Tateishi y cols. 1989, Cervantes 1993, Contreras 1994, Cervantes y cols. 1995).

En el presente estudio destaca la reducción progresiva de la frecuencia de descarga de la actividad multineuronal en el HIP, la SNr y la FRM durante el período de 7 días de tratamiento con P₄ antes del episodio de isquemia. Esta disminución de la frecuencia de descarga de la AMN ha sido descrita previamente con la administración aguda de P₄ y de algunas progestinas reducidas en la posición 5 α o 5 β en el anillo A

del esteroide (Kubli-Garfias y cols. 1976). Se ha descrito que la P₄ y algunos de sus metabolitos tienen la capacidad de incrementar la neurotransmisión GABAérgica provocando modificaciones alostéricas del receptor GABA_A. Principalmente cuando presenta una configuración $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ (Hawkinson y cols. 1994) que da como resultado el incremento de la duración de la apertura del ionóforo de Cl⁻ con la consecuente disminución de la excitabilidad de los componentes neuronales, principalmente en aquellas estructuras que tienen una abundante inervación GABAérgica con receptores GABA_A (Gee y cols. 1987, Smith y cols. 1987, Gee y cols. 1988, Paul y Purdy 1992, Orchinik y McEwen 1993, Hawkinson y cols. 1994, Mahesh y cols. 1996, Rupprecht y cols. 1996). Además, ha sido descrito que la biotransformación de la P₄ en el cerebro puede dar lugar a metabolitos activos con capacidad de interaccionar con el receptor GABA_A (Jung-Testas y cols. 1989, Baulieu 1991, Baulieu 1992, Paul y Purdy 1992, Costa y cols. 1994).

Se ha descrito asimismo una disminución de la excitabilidad neuronal como consecuencia del efecto de diversos agonistas GABAérgicos directos o indirectos del receptor GABA_A como son los barbitúricos, las benzodiazepinas y los esteroides anestésicos. Este efecto se ha señalado como un mecanismo celular de los sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivantes y anestésicos (Gisvold y cols. 1984, Hallmayer y cols. 1985, Gee y cols. 1987, Giusti y cols. 1992, Hawkinson y cols. 1994, Mellon 1994, Shiu y cols. 1983, Sternau y cols. 1989, Im y cols. 1989, Raisinghani y cols. 1968, Smith y cols. 1987, Wieland y cols. 1991, Smith 1991). Se puede sugerir que las diferencias encontradas en la disminución temporal de la AMN bajo el tratamiento con P₄ en el HIP, la SNr y la FRM reflejan que la inervación GABAérgica en dichas estructuras se manifiesta de manera diferente de acuerdo a las características de cada núcleo (Schumacher y cols. 1989, Bowery y cols. 1987)

En el presente estudio, la reducción de la AMN observada bajo el tratamiento con progesterona se asoció con la presencia de husos formados por ondas de mayor

voltaje que la actividad de base en el EEG y menor frecuencia, durante el período de tratamiento con P₄ antes del período de isquemia. Se ha descrito que la inhibición de la excitabilidad neuronal provocada por la administración aguda de P₄ y algunas progestinas se manifiesta por períodos de sincronización del EEG basándose en ondas lentas de alto voltaje alternadas con períodos de actividad rápida de bajo voltaje (Kubli-Garfias y cols. 1976).

Por todo lo anterior, la reducción de la AMN observada durante el tratamiento con P₄ antes del episodio de isquemia se puede atribuir al efecto de este compuesto o al de sus metabolitos activos en el SNC. En nuestros experimentos se mantuvo disminuida la frecuencia de descarga en la fase de pre-isquemia, de tal modo que se puede afirmar que la excitabilidad neuronal y el metabolismo neuronal se encontraban reducidos antes del período de isquemia; este mecanismo ha sido propuesto como protector (Verhaegen y cols. 1995, Fern y cols. 1996).

La AMN de los sujetos del grupo sham y del grupo bajo tratamiento con el vehículo de la P₄ no presentó modificaciones significativas durante el período pre-isquemia.

En los animales expuestos a isquemia y tratados con vehículo ocurrió una disminución marcada de la AMN en HIP, SNr y FRM en las horas y durante los 14 días posteriores al episodio de isquemia. Este fenómeno podría atribuirse a la reducción de la población neuronal en dichas estructuras; sin embargo, esta posibilidad solo fue compatible con los resultados de la evaluación histológica en el hipocampo. En éste se observó una pérdida significativa de la población neuronal en el estrato piramidal del asta de Ammon, pero no corresponde a los hallazgos cuantitativos en la SNr y no podría relacionarse con datos de la población neuronal de la FRM, dado que no fueron obtenidos en el presente estudio.

La disminución de la AMN encontrada en la SNr en las 6 h posteriores a la isquemia se podría explicar como resultado de la actividad de los circuitos neuronales

relacionados con las entradas GABAérgicas inhibitorias provenientes de las neuronas del núcleo caudado (NC) y del globus pallidus (GP) (Parent y Hazrati 1995) que al encontrarse hiperestimuladas por la isquemia, podrían provocar este efecto. Por otra parte, el que la frecuencia de descarga de la SNr se mantenga en el 10 % de su valor control en los 14 días posteriores al período de isquemia podría atribuirse a que las neuronas de las estructuras que proveen de inervación inhibitoria como son el NC y el GP sean muy resistentes a la isquemia, de modo que se mantuviera la inhibición sobre las neuronas de la SNr. Esto último no ha sido comprobado, para lo cual sería necesario el realizar un análisis cuantitativo de estas poblaciones neuronales.

En la FRM se ha descrito que las neuronas de sus diferentes núcleos contienen diferentes neurotransmisores (Scheibel 1980), las influencias inhibitorias que pueden tener estas neuronas provenientes de los diferentes núcleos cerebrales que los inervan podría manifestarse de una manera similar a lo observado en la SNr.

La isquemia provocó que la actividad multineuronal se mantuviera por debajo del 10 % del control, en las diferentes estructuras estudiadas del grupo tratado con P₄ en las horas siguientes al PCR. Sin embargo, la recuperación progresiva aunque parcial de la AMN durante los días siguientes al episodio de isquemia en este grupo, parece indicar la existencia de una condición funcional diferente a las de los otros grupos cuya actividad eléctrica no se recuperó.

En particular, la recuperación parcial de la AMN en el HIP, podría tener relación con la abundante inervación GABAérgica de la población neuronal del Asta de Ammon, y al incremento de su actividad inhibitoria atribuible al tratamiento con P₄. En la SNr y en la FRM podría suponerse una correlación similar.

El contraste entre la falta de recuperación de la AMN en el grupo tratado con vehículo y la recuperación de la AMN del grupo tratado con P₄, ésta última podría asociarse con el posible efecto neuroprotector de este esteroide o de sus metabolitos activos sobre las poblaciones neuronales de los diferentes núcleos cerebrales.

Otro parámetro importante como indicador del efecto protector de varios fármacos en contra del daño provocado por la isquemia sobre los componentes celulares del SNC, es la estimación de la población neuronal del hipocampo dorsal (Kogure y cols. 1988, Pulsinelli y cols. 1982, Pulsinelli 1985, Kuroiwa y cols. 1990, Kuroiwa y cols. 1991, Kirino 1982, Kirino y cols. 1986, Schmidt-Kastner y cols. 1990).

El hipocampo ha sido estudiado por diversos investigadores debido a que sus neuronas piramidales son muy vulnerables a la isquemia. Pulsinelli y cols. (1982) han descrito el perfil temporal de daño neuronal debido a diferentes períodos de isquemia cerebral global transitoria en la rata. Kirino (1982) reporta daño de las neuronas del CA1 del hipocampo a las 48 h pos-isquemia, en gerbos con un período de 5 min. de isquemia. El daño histopatológico depende de la duración del período de isquemia.

En este estudio se observó una pérdida importante (85 %) de la población neuronal del área CA1 del hipocampo debida a un período de 16 - 18 min. de isquemia, además de una reacción glial intensa. Nosotros no observamos cambios morfológicos provocados por la isquemia debido a que la fijación de los cerebros para estudio histológico se llevó a cabo a los 21 días posteriores a la isquemia y ya para este tiempo solo se observan las neuronas supervivientes.

El presente estudio muestra el efecto protector de la P₄ sobre la población neuronal de las áreas CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo. Se puede considerar que este fenómeno pueda deberse al efecto de la P₄ y de algunos de sus metabolitos que incrementan la eficiencia de la neurotransmisión GABAérgica, la modulación alostérica del receptor GABA_A que permite el influjo de Cl⁻ ha sido mencionado como el mecanismo clave de este fenómeno en neuronas en estudios *in vitro* (Gee y cols. 1987, Smith y cols. 1987, Gee y cols. 1988, Paul y Purdy 1992, Orchinik y McEwen 1993, Hawkinson y cols. 1994, Mahesh y cols. 1996, Rupprecht y cols. 1996, Shuaib y Breker-klassen 1997).

Dada la evidencia que muestra que, el incremento de la neurotransmisión GABAérgica en los circuitos neuronales del hipocampo constituye un mecanismo de protección de las neuronas piramidales en contra de los fenómenos fisiopatológicos inducidos por la isquemia que, puede llevar al daño irreversible de éstas (Sternau y cols. 1989, Schwartz y cols. 1994, Schwartz y cols. 1995, Shuaib y cols. 1992, Johansen y Diemer 1991, Johansen y cols. 1991, Shuaib y cols. 1993, Shuaib y cols. 1995, Juurlink y Sweeney 1997), se ha comprobado que, el uso de agonistas del receptor GABA_A disminuye el daño provocado por la isquemia (Hallmayer y cols. 1985, Shapiro 1985, Kirino y cols. 1986, Cervantes y cols. 1989, Karlsson y Stten 1989, Schmidt-Kastner y cols. 1990, Schwartz y cols. 1994, Schwartz y cols. 1995).

Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos de muerte neuronal isquémica son múltiples y se describen interacciones entre ellos (Raichle 1983, Hossman 1985, Kaplan y cols. 1987, Kogure y cols. 1988, Krause y cols. 1988, Haddad y Jiang 1993, Siesjö y cols. 1995). Está bien establecido que la excitotoxicidad mediada por el neurotransmisor excitatorio, glutamato como una de las principales causas de la muerte neuronal (Hashimoto y cols. 1994, Chow y Haddad 1998). Se ha observado que la exposición de las neuronas corticales al glutamato o a la anoxia provoca un incremento en el calcio intracelular y cambios morfológicos que van desde el edema celular hasta la lisis de las mismas, presentándose estos cambios con latencias más cortas cuando las neuronas son expuestas al glutamato que a la anoxia (Chow y Haddad 1998).

De esta manera, el efecto neuroprotector de las drogas que incrementan la neurotransmisión GABAérgica ha sido propuesto como debido a la reducción de la excitabilidad neuronal y de su relación con la excitotoxicidad mediada por el glutamato que activa varias vías que conducen a la muerte neuronal, dependientes del calcio incluyendo la expresión genómica y que de otra manera puede resultar en muerte neuronal pos-isquémica inmediata o tardía (Sternau y cols. 1989, Schwartz y cols. 1994, Schwartz y cols. 1995, Shuaib y cols. 1992, Johansen y Diemer 1991, Shuaib y

cols. 1993, Shuaib y cols. 1995, Johansen y cols. 1991, Hill-Venning y cols. 1992, Nilsson y Lutz 1993, Walker y Carlock 1993, Hawkinson y cols. 1994, Schreiber y Baurdry 1995, Abe y cols. 1995, Chow y Haddad 1998).

Las neuronas piramidales del área CA1 son conocidas como muy vulnerables a la isquemia (Kirino y Sano 1985, Wieloch 1985) y la progesterona mostró un efecto neuroprotector parcial, como se puede observar por la preservación significativa de dicha población neuronal en comparación con las gatas sometidas a isquemia y tratadas con vehículo. Esta neuroprotección parcial puede sugerir que, en estas neuronas altamente vulnerables, la muerte puede ocurrir a través de mecanismos que no son susceptibles de ser modificados por las acciones de la progesterona y de sus metabolitos. Vale la pena mencionar que las concentraciones de P_4 en el suero de las gatas experimentales, fueron comparables a las concentraciones que se observan durante la gestación en dichos animales, se saben que estas concentraciones en plasma no tienen efecto anestésico (Stabenfeldt 1974, Verhage y cols. 1976).

Los resultados de la deficiencia neurológica en el presente estudio sugieren la capacidad de la recuperación funcional del SNC después de la isquemia, aún en ausencia de algún tratamiento neuroprotector, como ha sido descrito por Tateishi y cols. (1989). En este último las deficiencias neurológicas observadas en los gatos a los 4 días pos-isquemia tanto en los grupos tratados con nimodipina como en los tratados con placebo no muestran diferencias estadísticamente significativas. En ambos estudios se utiliza la misma escala de evaluación neurológica (Todd y cols. 1982). Sin embargo, el efecto neuroprotector de la progesterona fue evidente ante el hallazgo de puntajes significativamente menores en el grupo tratado con P_4 en comparación con el grupo tratado con vehículo. De ese modo, se puede concluir que el efecto neuroprotector de la P_4 ocurre también sobre las neuronas de otras estructuras cerebrales diferentes del hipocampo, la SNr y la FRM dado que un amplio conjunto de

los fenómenos neurológicos, incluidos en la escala de Todd, dependen de la integridad anatómo-funcional de otras estructuras diferentes de las que aquí se mencionan.

En otros estudios, acerca del efecto neuroprotector de fármacos, se ha podido establecer una relación entre la pérdida de la población neuronal del hipocampo provocada por la isquemia y el deterioro de las funciones integradas por esta estructura cerebral cuando se han realizado pruebas electrofisiológicas y conductuales específicas (Lacaille y cols. 1989, Block y Schuarz 1998). Block y Schuarz (1998) muestran que el aprendizaje espacial se relaciona con el daño de las neuronas del área CA1 del hipocampo. Además existe una correlación entre las ratas que nadan cerca de la pared del laberinto con agua y el daño neuronal en el área CA1 del hipocampo, lo que refleja una estrategia diferente para resolver esta tarea. Se observa también que la memoria espacial se encuentra deteriorada, al observarse que el tiempo de latencia para encontrar la plataforma sumergida es similar en todas las pruebas, en comparación con el grupo sham, en el cual estas latencias se acortan en las últimas pruebas (Block y Schuarz 1998).

Las pruebas electrofisiológicas se han llevado a cabo mediante registros intracelulares de las neuronas para poder medir sus respuestas bajo diferentes condiciones experimentales y registrar los potenciales característicos de los diferentes tipos celulares en el hipocampo (Lacaille y cols. 1989).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sustentan el efecto neuroprotector de la P₄ contra el daño provocado por la isquemia cerebral global aguda en el gato. Asimismo, constituyen un punto de partida para la realización de otros estudios que tiendan a investigar las características moleculares de dicho efecto neuroprotector.

APÉNDICE

Hipocampo

La formación hipocámpica, estructura bilateral está situada en la parte dorsomedial de cada hemisferio cerebral, se extiende desde el agujero interventricular hasta la parte rostral en el piso de la prolongación temporal del ventrículo lateral y por delante de la lámina terminal donde forma el rudimento prehipocámpico que constituye la parte anterior del hipocampo primitivo, se continúa hacia abajo con el núcleo olfatorio anterior y la parte lateral de la sustancia perforada anterior. Por delante del rudimento prehipocámpico se halla el área preolfatoria. Las formaciones hipocámpicas derecha e izquierda se relacionan por medio de fibras que pasan por la lámina terminal y forman parte de la comisura anterior (López-Antunez 1979, Mishkin y Appenzeler 1990).

La formación del hipocampo presenta tres zonas: la fascia dentada (vecina a la cisura coroidea), el asta de Ammon o hipocampo (intermedia) y el subículo (contiguo al neopallio). El hipocampo posee una corteza trilaminar muy primitiva (arquipallio) a nivel de la fascia dentada y del asta de Ammon, pero en el subiculum hay una zona transicional hacia la corteza neopalliar de seis capas (corteza entorrinal) (López-Antunez 1979, Mishkin y Appenzeler 1990).

En el hipocampo se reconocen los siguientes estratos a partir de la superficie ventricular.

1.- El estrato alveus, por donde cursan fibras aferentes que llegan al hipocampo de otras regiones y fibras eferentes que son los axones de las células piramidales.

2.- El estrato oriens en donde además de las fibras aferentes y eferentes, se encuentran las células en cesta y otras pequeñas células de forma variable cuyos axones se dirigen en su mayor parte a los estratos más profundos.

3.- El estrato de células piramidales, formado principalmente por grandes células de tipo piramidal que dan origen a dendritas basales que se distribuyen horizontalmente por el estrato oriens y una dendrita apical que se ramifica en los estratos radiado y

molecular situados más profundamente; de la base de su soma parte el axón que después de cursar por el estrato oriens y el alveus pasa a la fimbria y posteriormente al fórnix para constituir la principal vía eferente del hipocampo. Los axones de las células piramidales dan ramas colaterales (colaterales de Schaffer), que penetran al estrato lacunoso-molecular donde hacen sinapsis con las dendritas apicales de otras células piramidales.

4.- El estrato radiado sigue a continuación; en éste se arborizan las dendritas apicales de las células piramidales.

5.- El estrato lacunoso-molecular que es el más profundo, contiene las ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las células piramidales, interneuronas diseminadas y fibras que llegan al hipocampo.

Tomando en cuenta sus características arquitectónicas y conexiones, Lorente de Nó, ha subdividido el asta de Ammon en varios campos: CA1, CA2, CA3 y CA4 o hilio (López-Antunez 1979, Mishkin y Appenzeler 1990).

La fascia dentada o giro dentado está constituido por las capas molecular o superficial, la granular o intermedia y la polimórfica o profunda. Contiene neuronas de axón corto (Golgi Tipo II), cuyos axones y dendritas se distribuyen dentro de la capa en que están situadas. Las fibras musgosas son los axones de las células de la capa granular que dan colaterales para la capa polimórfica y que llegan hasta el asta de Ammon, haciendo sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas que se localizan en el estrato radiado. Otros axones de las células granulares llegan al estrato alveus y se incorporan a la fimbria.

El subículo se continua lateralmente con la corteza entorrinal, está formado por el parasubículo (contiguo a la corteza entorrinal), el presubículo, el subículo y el prosubículo que esta separado del giro dentado por la cisura hipocámpica.

El hipocampo descarga sus impulsos a través del fórnix, que esta formado por los axones de las células piramidales y en pequeña proporción por los de células

situadas en la fascia dentada. Las fibras pasan primero a la fimbria situada en el borde medial del hipocampo, sobre su superficie ventricular, dorsal a la fascia dentada. Al llegar a la parte caudal del hipocampo, por debajo del esplenio del cuerpo caloso la mayor parte de las fibras de la fimbria pasan a las columnas posteriores del fórnix, un pequeño número cruza en la comisura hipocámpica y otras alcanzan la superficie dorsal del cuerpo caloso donde se incorporan a las estrías mediales y laterales y forman el fórnix dorsal; gran parte de estas últimas pasan a través del cuerpo caloso para unirse al fórnix principal. Las columnas del fórnix (crura fornicis), contornean la parte posterior del tálamo y se unen bajo el cuerpo caloso para formar el cuerpo del fórnix. A nivel del foramen interventricular se originan las columnas anteriores del fórnix que descienden divergiendo para perderse paulatinamente en las paredes laterales de cada ventrículo lateral. Al aproximarse a la comisura anterior, las fibras del fórnix se separan en un componente precomisural y otro postcomisural. A través de la fimbria y el fórnix, el hipocampo envía impulsos a los núcleos de la región septal, al área preóptica y a los núcleos anteriores del hipotálamo y a las áreas hipotalámicas ventral y lateral, núcleo anterior del tálamo y núcleos del cuerpo mamilar. El cuerpo mamilar descarga impulsos al núcleo anterior del tálamo por el haz mamilotalámico y al tegmento mesencefálico por el haz mamilotegmental (López-Antunez 1979, Mishkin y Appenzeler 1990).

Las fibras aferentes llegan al hipocampo a través de las vías perforante y alvear, proceden en su mayor parte de la corteza entorrinal y pasan por el subículo y el parasubículo respectivamente. Las fibras de la vía perforante terminan en el estrato lacunoso-molecular y las de la vía alvear en el estrato alveus y en el estrato oriens. Gran parte de las que llegan al estrato lacunoso-molecular provienen de la corteza entorrinal del lado opuesto y alcanzan el hipocampo pasando por la comisura hipocámpica, las fibras que terminan en el estrato alveus y en el estrato oriens proceden del área entorrinal del mismo lado. Las fibras de la corteza del cíngulo cursan

por el fascículo homónimo y llegan al asta de Ammon y en gran parte al subículo del cual parten impulsos a aquella (López-Antunez 1979, Mishkin y Appenzeler 1990).

La mayor entrada excitatoria son las fibras de la vía perforante, las cuales se originan en la corteza entorrinal y terminan en las 2 terceras partes externas de la capa molecular dentada en contacto sináptico con dendritas de otras células granulares. Las fibras musgosas que provienen de las células granulares interactúan sinápticamente con las dendritas apicales de las células piramidales del área CA3 en el estrato lucidum. La tercera vía excitatoria polisináptica del hipocampo es la de las colaterales de Schaffer de las células piramidales del área CA3 que terminan en las dendritas apicales de las células piramidales del área CA1 cuyos axones proyectan hacia el subiculum y la corteza entorrinal. Las células piramidales del área CA3 proyectan fibras colaterales de tipo excitatorio hacia el septum lateral y hacia el hipocampo contralateral y colaterales intrínsecas hacia partes más septales o laterales del área CA3. Un sistema de fibras comisurales e ipsilaterales está formado por las fibras que provienen de las células del hilio y que llegan a el tercio interno de la capa molecular dentada contralateral e ipsilateral (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

El glutamato y al aspartato son los transmisores excitatorios del hipocampo (Nadler y cols. 1976). La corteza entorrinal provoca la liberación de glutamato de la fascia dentada, la cual a su vez provocará la liberación de glutamato de las proyecciones piramidales del campo CA3 hacia el campo CA1 y del hipocampo contralateral (Spencer y cols. 1981).

Se ha considerado que el hipocampo tiene a los 3 tipos de receptores para glutamato, como son el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), el receptor para quisqualato y el receptor para ácido kaínico (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

El receptor NMDA se encuentra preferentemente en el estrato radiado y en el estrato oriens particularmente en el campo CA1, los receptores para ácido kaínico se encuentran localizados en la zona de la fibras musgosas y los receptores para

quisqualato presentan una distribución parecida a la de los receptores NMDA (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

Estudios electrofisiológicos sugieren que la transmisión sináptica excitatoria rápida involucra principalmente a receptores para quisqualato y ácido kaínico y que los receptores NMDA están involucrados en los eventos moduladores lentos, tal como la potenciación a largo término y que median una menor parte de los potenciales pos-sinápticos excitatorios monosinápticos en el campo CA1 (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

Las vías excitatorias del hipocampo además pueden contener otras sustancias neuroactivas como la colecistoquinina, las encefalinas y las dinorfinas aunque no se sabe si estas coexisten con el glutamato o el aspartato, o se encuentran en vías separadas (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

Las fibras musgosas provenientes del giro dentado tienen glutamato o aspartato como transmisor y se ha observado que las células que se encuentran junto a estas células musgosas contienen descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) que indica la presencia del neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido γ -amino-butírico) y establecen uniones en la zona de la capa molecular. Otras neuronas en el hilio tienen fibras inmunoreactivas a somatostatina que se dirigen a la zona externa de la capa molecular dentada (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

El GABA es el mayor aminoácido inhibitorio en el hipocampo, se ha localizado en las células en cesta y en sinapsis axo-axónicas, su papel es probablemente para controlar la excitabilidad de las neuronas piramidales. Los segmentos iniciales de los axones de las células piramidales presentan una densa inervación GABAérgica proveniente de las células en cesta (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

El efecto hiperpolarizante del GABA en el hipocampo se lleva al cabo a través de 2 tipos de receptores: el receptor GABA_A sensible a bicuculina y acoplado a un canal de cloro, que es el responsable de los potenciales pos-sinápticos inhibitorios "rápidos"

(IPSP). Así mismo, el receptor GABA_B que es activado por baclofen, esta acoplado a proteínas G y produce IPSP "lentos" al incrementar la conductancia membranal para el K⁺ (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

Aunque la acción del GABA está usualmente asociada con hiperpolarización, se ha descrito también un efecto despolarizante en las capas dendríticas provocando un incremento en la conductancia membranal y sirve para modular los potenciales pos-sinápticos producidos por la entrada excitatoria (Ottersen y Storm-Mathisen 1989).

Las vías de entrada excitatoria en el hipocampo pueden excitar directamente a las células piramidales e interneuronas. Las células piramidales están bajo inhibición GABAérgica del tipo de anteroalimentación (feed-forward).

El circuito trisináptico de la fascia dentada y del asta de Ammon está compuesto de tres tipos celulares principales: células granulares dentadas, las grandes células piramidales del campo CA3 y las pequeñas células piramidales del campo CA1. Este circuito está arreglado en una orientación laminar transversa hacia el eje septotemporal. Las neuronas que presentan axones que arborizan localmente se denominan "neuronas de circuito local o interneuronas", son inhibitorias y se han identificado 3 tipos en el campo CA1: en Cesta (b), Oriens/Alveus (O/A) y Lacunoso-Molecular (L/M).

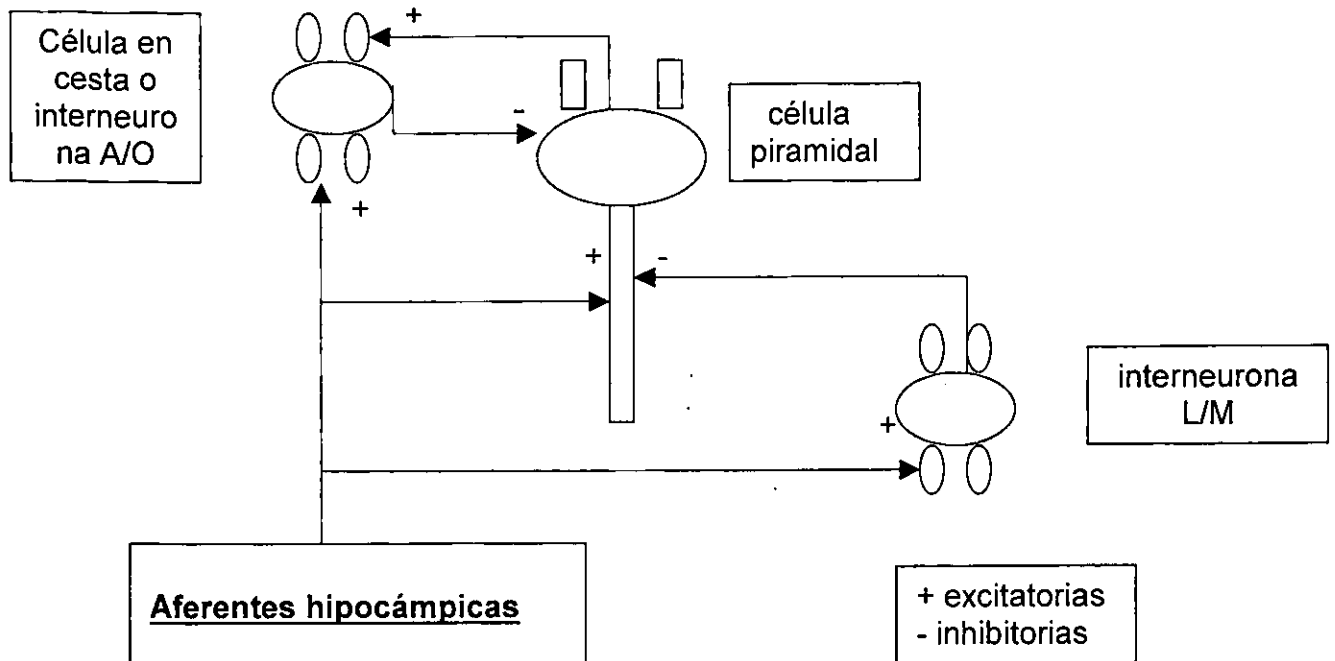
Las células en cesta y sus plexos axonales se encuentran alrededor del soma de las células piramidales en el estrato piramidal. Las células de soma grande tienen aproximadamente 45 micras de diámetro, tienen dendritas basales que llegan hasta el estrato oriens y dendritas apicales que ascienden dentro del estrato radiado y lacunoso-molecular. Los axones de las células en cesta se proyectan lateralmente por varios cientos de micras, dan muchas colaterales que entran en el estrato piramidal y forman plexos parecidos a cestas alrededor de los somas de las células piramidales. La célula en cesta contiene un núcleo de forma irregular, numerosos organelos y su retículo endoplásmico es denso; sus dendritas son de tipo espinoso con abultamientos

periódicos y reciben muchos contactos sinápticos. Los procesos axonales también muestran alargamientos periódicos llamados varicosidades que terminan en contactos sinápticos simétricos.

Las células en cesta son estimuladas por las colaterales de Schaeffer y las fibras comisurales provenientes del estrato radiado. La estimulación de las células en cesta evoca un potencial pos-sináptico inhibitorio (IPSP) que es más rápido que el potencial excitatorio pos-sináptico excitatorio (EPSP) de las células piramidales cuando ambas células son estimuladas en los mismos sitios. De modo que, los IPSP de las interneuronas llegan a tener un pico más rápido que los EPSP de las células piramidales. Cuando se incrementa la intensidad del estímulo, los EPSP usualmente desencadenan una descarga de potenciales de acción. Las células en cesta pueden ser activadas en una manera de anteroalimentación (feed-forward) y son estimuladas por estas entradas con una latencia más corta que las células piramidales (Lacaile y cols. 1989).

Las células piramidales al ser estimuladas, estimulan a las células en cesta y las células en cesta envían axones a las células piramidales de manera que las inhiben (feed-back). Las células en cesta tienen contactos sinápticos principalmente con el soma de las células piramidales pero también con las dendritas proximales y basales de las mismas. Además tienen contacto con procesos dendríticos de otras interneuronas.

En el área CA3, las interneuronas que se encuentran en el estrato oriens-alveus presentan un soma multipolar, su axón mide 20-30 micras de diámetro y sigue una trayectoria horizontal por el borde de este estrato. Los axones de estas interneuronas se ramifican profusamente en el estrato oriens y en el estrato piramidal y han mostrado inmunorreactividad para el neurotransmisor GABA y para el factor inhibitorio de la liberación de la somatotropina.



Las interneuronas A/O reciben fibras excitatorias de las células piramidales del área CA3 ipsilateral y contralateral. La respuesta excitatoria de las interneuronas A/O es más intensa que la de las células piramidales y sus potenciales de acción se producen con una latencia más corta. Esto indica que las interneuronas de tipo A/O son estimuladas en forma de anteroalimentación y su excitación es más rápida que la de las células piramidales. Las interneuronas de tipo A/O envían axones hacia las células piramidales del área CA1 las hiperpolarizan lentamente y al mismo tiempo inhiben rápidamente a las neuronas piramidales del área CA3 (Lacaile y cols. 1989).

Las interneuronas de tipo L-M presentan una forma fusiforme o multipolar, se localizan en el borde del estrato lacunoso y el estrato molecular y en la región CA3 penetran hacia el estrato radiado. Los árboles dendríticos y axonales de estas interneuronas se han encontrado desde la segunda hasta la tercera porción de la región CA1 y en parte de la fascia dentada. Los axones de las interneuronas L-M son de aspecto varicoso, emergen usualmente cerca de una dendrita primaria en el estrato

lacunoso-molecular y envían proyecciones unos milímetros a través de la capa L-M, estas proyecciones se ramifican inmediatamente en el estrato radiado, algunos procesos axonales se ramifican en el estrato piramidal y en el estrato oriens. Las proyecciones axonales no se restringen únicamente a la región CA1, algunas colaterales ascienden a través del estrato lacunoso-molecular, a través de la cisura hipocámpica y llegan hasta la capa molecular de la fascia dentada. Las interneuronas L-M son similares a las otras células no piramidales en que presentan muchos contactos sinápticos con sus dendritas espinosas (Lacaile y cols. 1989).

Las fibras aferentes excitatorias e inhibitorias inciden en las interneuronas L-M, con EPSPs e IPSPs provocados por la estimulación de las principales vías de fibras al hipocampo. Así como en las interneuronas en cesta y las A/O, la estimulación de las interneuronas L-M es más rápida que la estimulación de las células piramidales como resultado de la antero-activación. También se ha observado que la estimulación en la capa molecular en la fascia dentada provoca EPSP en las interneuronas L-M. Las proyecciones de las fibras excitatorias e inhibitorias aferentes tienen, no obstante, diferentes orientaciones. Las fibras eferentes excitatorias corren transversalmente al eje septotemporal del hipocampo, mientras que las aferentes inhibitorias llevan una orientación longitudinal. De modo que, las aferentes excitatorias aparentan tener una trayectoria laminar y las aferentes inhibitorias una trayectoria interlaminar (Lacaile y cols. 1989).

Las fibras aferentes excitatorias de las interneuronas L-M son las colaterales de Schaffer, las fibras comisurales y las fibras de la corteza entorrinal ipsilateral. El origen de las aferentes inhibitorias permanece desconocido. Sin embargo, puesto que la inhibición de interneurona a interneurona ha sido observada en la región CA1 y puesto que han sido observados contactos sinápticos simétricos GAD-positivos en las interneuronas L-M en la región CA3, la inhibición de las interneuronas L-M en la región

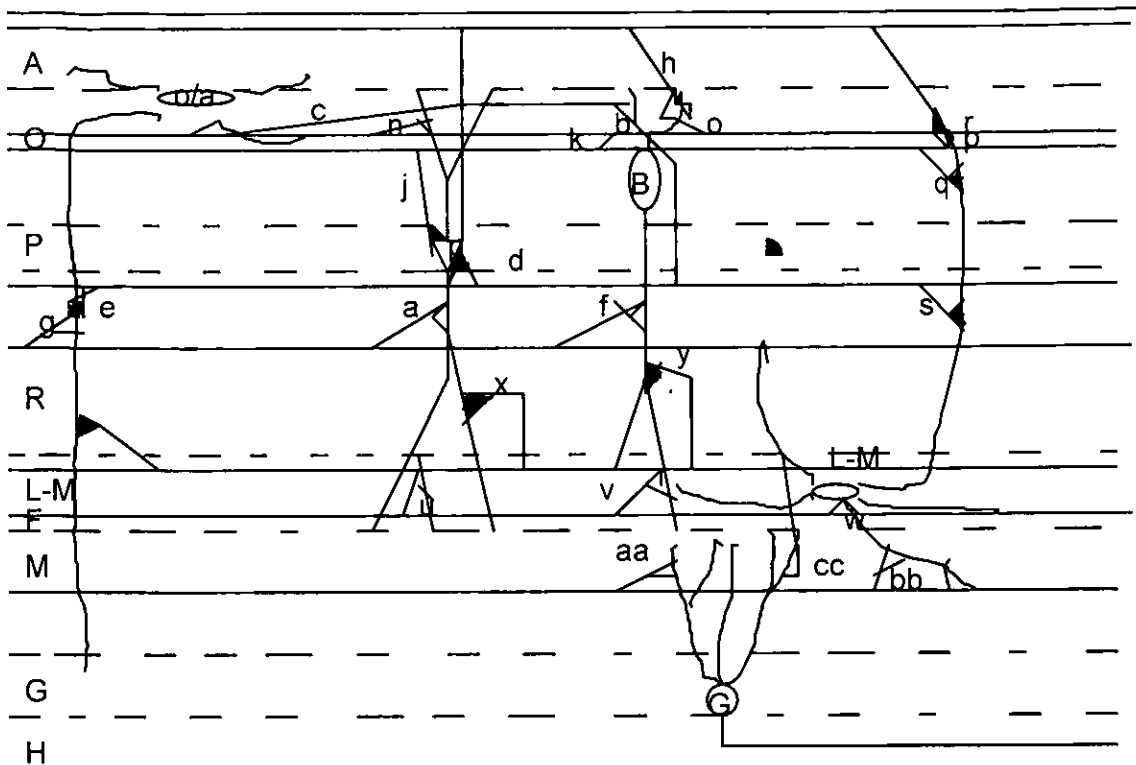
CA1 es probable que se origine en otras interneuronas inhibitorias de la misma región (Lacaile y cols. 1989).

Otros 3 grupos de aferentes extrahipocámpicas inervan densamente al estrato lacunoso-molecular: las aferentes colinérgicas del septum, las aferentes serotoninérgicas del rafe y las aferentes noradrenérgicas del locus coeruleus.

Las interneuronas del L-M inhiben a las células piramidales pero las células piramidales no inhiben ni excitan a las interneuronas L-M. La inhibición hiperpolarizante bloquea las espigas pos-sinápticas provocadas en las células piramidales. Los IPSP provocados en las dendritas de las células piramidales por estimulación de las células L-M son sensibles a variaciones en el potencial de membrana, en donde la amplitud de los IPSP se incrementa con la despolarización de la membrana de las células piramidales y la hiperpolarización disminuye cuando la membrana de las células piramidales está hiperpolarizada. Las interneuronas L-M inhiben a las interneuronas del estrato piramidal y no hay conexiones sinápticas en dirección inversa (Lacaile y cols. 1989).

Las interneuronas L-M tienen contactos sinápticos axodendríticos con células piramidales e interneuronas de la región CA1 en el estrato lacunoso molecular y radiado. Las interneuronas L-M inhiben también a las células granulares de la fascia dentada y a las interneuronas del estrato molecular (Lacaile y cols. 1989).

ESTA TERCERA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



 No definido
  Inhibitorio
  Excitatorio

Diagrama de un circuito local de la región CA1. A, alveus; O, oriens; P, piramidal; R, radiado; L-M, lacunoso molecular; F fisura hupocampica. Giro dentado: M, molecular; G capa granular; H, hilio.

Una célula granular y parte de la fascia dentada se incluyen en el diagrama debido a que los procesos de las interneuronas L-M penetran en la fascia dentada. Se muestran una célula piramidal (P), una célula en cesta (B), una interneurona oriens/alveus (O/A), una interneurona lacunoso-molecular (L-M), y una célula granular.

Se muestran las fibras aferentes con sinapsis excitatorias con las células O/A, P, B y L-M en el estrato lacunoso-molecular (sinapsis t, u, v, w respectivamente), en el estrato radiado (sinapsis g, a, f y l) y en el estrato oriens (sinapsis m, n, o y p). La mayor eficacia de estas sinapsis sobre las interneuronas resulta en una excitación más temprana de interneuronas de O/A, B y L-M con respecto a las células piramidales. Las fibras aferentes del estrato alveus hacen sinapsis excitatorias sobre las células O/A, B y

L-M (sinapsis i,h y r). Las fibras aferentes en el estrato moléculas de la fascia dentada tienen sinapsis excitatorias con las células G y las interneuronas L-M (sinapsis aa y bb) (Lacaile y cols. 1989).

Las células piramidales presentan sinapsis excitatorias con las interneuronas B y O/A (sinapsis b y c). Las células en cesta presentan sinapsis inhibitorias con el soma de las células piramidales (sinapsis d) y posiblemente con interneuronas O/A e interneuronas L-M (sinapsis e y s). Las interneuronas presentan sinapsis inhibitorias con el soma de las células P y B (sinapsis j y k) y posiblemente con interneuronas L-M (sinapsis q). Las interneuronas L-M presentan sinapsis inhibitorias con las dendritas de las células P (sinapsis x) en el estrato piramidal, posiblemente con células B (sinapsis y) y posiblemente con interneuronas O/A (sinapsis z). Las interneuronas L-M presentan sinapsis inhibitorias con las células G (sinapsis cc) y con interneuronas de la fascia dentada (Lacaile y cols. 1989).

Sustancia nigra

La sustancia nigra es una estructura que se localiza en el mesencéfalo, en posición dorsal a los pedúnculos cerebrales y ventral al núcleo rojo. Está formada por varias regiones siendo las principales la pars compacta (SNc) constituida principalmente por neuronas dopaminérgicas y la pars reticulata (SNr) que tiene principalmente neuronas GABAérgicas (López Antunez 1979).

La SNr es un componente integral de la vía de salida de los ganglios basales y tiene un papel muy importante en el control del comportamiento motor. Este núcleo recibe inervación GABAérgica del neostriado (núcleo caudado y putamen) y del globus palidus. En el estriado dorsolateral los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) regulan la liberación de GABA en las neuronas de la SNr (Morari y cols. 1996). Las neuronas de la SNr además de GABA contienen metionina, encefalina y sustancia P (Difiglia y cols. 1981, Haber y Elde 1982).

Las neuronas de la SNr en el gato y otras especies son de tres tipos morfológicos: neuronas de proyección, de tamaño grande con un soma de diámetro medio entre 23 a 26 μm , neuronas de tamaño mediano cuyo un soma mide entre 8 y 16 μm , con extensos campos dendríticos y neuronas de tamaño pequeño (probablemente interneuronas) con dendritas pequeñas. Las neuronas de gran tamaño son de forma triangular o poligonal con un eje mayor de 36 x 50 μm y menor de 23 x 32 μm . El soma de las neuronas de tamaño mediano es liso y pueden ser de forma triangular, fusiforme ovoide o poligonal y miden en su eje mayor 16-39 μm y en su eje menor 8-16 μm (Grofová y cols. 1982, Poirier y cols. 1983).

Las neuronas GABAérgicas de la SNr tienen tanto receptores GABA_A como GABA_B, pero su inhibición tónica está dada principalmente por el receptor GABA_A. Los agonistas para ambos receptores tienen un efecto inhibitorio sobre la frecuencia de descarga de estas neuronas pero solo el antagonista bicuculina que es específico para el receptor GABA_A incrementa la frecuencia de descarga de estas neuronas en forma significativa (Rick y Lacey 1994).

En la sustancia nigra reticulata existen circuitos intrínsecos que se establecen por medio de axones colaterales inhibitorios de las neuronas que arborizan dentro de la misma, intervando probablemente las proyecciones de otras neuronas; de esta manera se observa una inhibición recurrente y la modulación de su inhibición neuronal (Deniau y cols. 1982). Estas neuronas también envían colaterales a sitios discretos en la pars compacta, provocando potenciales inhibitorios en las neuronas dopaminérgicas mediados por receptores GABA_A. Cuando se estimula a las neuronas localizadas en el área dorsomedial o peripeduncular de la SNr las neuronas de la SNc responden con potenciales inhibitorios en un campo que tiene forma de cono y se extiende aproximadamente 500 μm en dirección medio-lateral.

Las neuronas dopaminérgicas están agrupadas en módulos funcionales cuya mayor inhibición se deriva de circuitos locales de las colaterales de las células de la

pars reticulata adyacente. Esto podría representar la unidad básica funcional de este núcleo (Hajós y Greenfield 1994). La inhibición de la SNc por la SNr esta mediada por interneuronas GABAérgicas, por axones colaterales de las neuronas de la SNr o por axones colaterales que inervan a las interneuronas y estas a su vez a las neuronas de la SNc. La inhibición de las neuronas de la SNc está mediada por el neurotransmisor GABA y por receptores GABA_A (Tepper y cols. 1995).

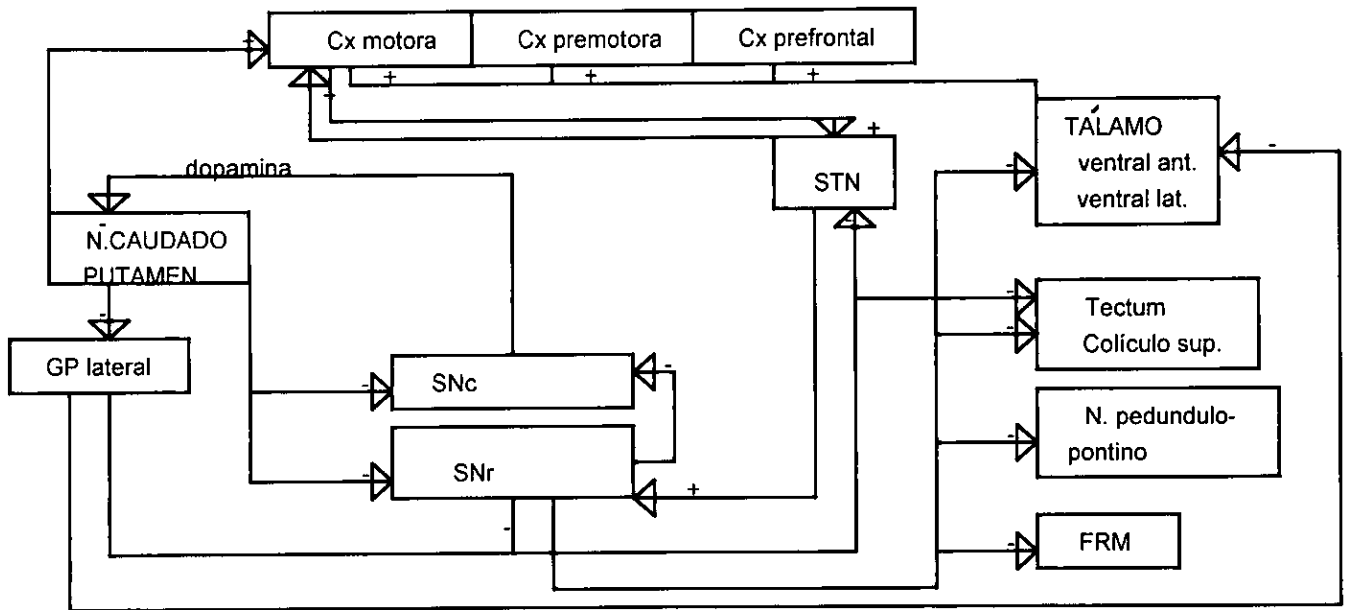
Las neuronas GABAérgicas de la SNr proyectan hacia el tálamo, los núcleos pedunculopontinos y el colículo superior.

El estriado dorsolateral recibe proyecciones de la corteza cerebral motora por la vía corticoestriatal que es glutamatérgica. En el estriado existen dos tipos de poblaciones neuronales que son GABAérgicas, una que proyecta hacia las neuronas GABAérgicas de la SNr y otra que llega al segmento interno del globus palidus.

Existen conexiones entre el neostriado (CN), el pálido, el núcleo subtalámico (STN) y la SN; las eferentes inhibitorias GABAérgicas directas del CN proyectan a las neuronas e interneuronas de la SNr y de la SNc. Estas últimas están interconectadas por aferentes GABAérgicas de la SNr y de la SNc; las neuronas dopaminérgicas de la SNc envían proyecciones hacia el CN. Del CN existen proyecciones GABAérgicas indirectas hacia el GP lateral y de éste la inervación GABAérgica llega al STN y a la SNr. El STN proyecta eferentes excitatorias glutamatérgicas hacia la SNr, el STN está influenciado directamente por aferentes excitatorias corticales.

La SNr y el globus palidus proyectan a otras estructuras además de los ganglios basales con proyecciones GABAérgicas que inhiben tónicamente a los núcleos talámicos ventral anterior y ventral lateral; este último envía proyecciones excitatorias glutamatérgicas hacia la corteza cerebral (Parent y Hazrati 1995). La SNr proyecta hacia la división medial del núcleo lateral ventral (VLm), la parte magnocelular del núcleo anterior ventral (VAmc) y el núcleo medio dorsal del tálamo en monos y ratas. La salida nigro talámica se sugiere que se continua principalmente hacia la corteza

prefrontal. La proyección nigro-talámica se considera ser inhibitoria en gatos. La salida nigrotalámica hacia el núcleo medio-dorsal es también inhibitoria y está relacionada al menos con el área dorsal prefrontal (PF) en el gato. Las proyecciones nigro-talámicas y pálido-talámicas se consideran como los dos principales sistemas de salida de los ganglios basales. La salida pálido-talámica se sabe que es inhibitoria y está relacionada directamente con las áreas motora y premotora de la corteza cerebral (Miyamoto y Jinnai 1994).



+ intervención excitatoria
 - intervención inhibitoria

Diagrama del circuito neuronal entre la sustancia negra pars reticulata (SNr), la sustancia negra pars compacta (SNc), la formación reticular mesencéfala (FRM), el núcleo (N) pedunculo-pontino, el colículo superior, el tectum, el tálamo, el núcleo subtalámico (STN), las cortezas (Cx) motora, premotora y prefrontal, el núcleo caudado, el putamen y el globus pálido (GP) lateral.

Limpieza: presente (0), ausente (4).	0-4																		
K) MARCHA:																			
Normal	0																		
Paresia y ataxia mínimas; capaz de caminar.	5																		
Capaz de levantarse y apoyarse solo; tropiezo y cae frecuentemente.	10																		
Incapaz para levantarse solo; tropiezo y cae frecuentemente cuando uno la levanta.	15																		
Incapaz para levantarse, movimientos propositivos cuando se le levanta de la cola. Paresia severa.	20																		
Ausencia de movimientos propositivos.	25																		
TOTAL																			

Normal 0

Deficiencia neurológica severa 100

REFERENCIAS

- Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y. (1995). Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. *Stroke*. 26: 1478-1489.
- Adams HP, Brot TG, Crowell RM, Furlan AJ, Gómez RF, Grotta J, Helgason CM, Marler JR, Woolson RF, Zinin JA, Feinberg W, Mayberg M. (1994). Guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. *Circulation*. 90: 1588-1601.
- Akai F, Yanagihara T. (1993). Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res*. 603: 87-95.
- Araki T, Kato H, Kogure K. (1989). Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: Distribution and time course. *Acta Neurol Scand*. 80: 584-553.
- Arnold AP. (1984). Androgen regulation of motoneuron size and number. *Trends in Neurosci*. 7: 238-242.
- Atkinson RM, Davis B, Pratt MA, Shape HM, Tomich EG. (1965). Action of some steroids on the central nervous system of the mouse. II. Pharmacology. *J Med Chem*. 8: 426-432.
- Barron KD, Schreiber SS, Cova JL, Scheibly ME. (1977). Quantitative cytochemistry of RNA in axotomized feline rubral neurons. *Brain Res*. 130: 469-481.
- Basar E. (1980). The alpha rhythm and the invariant alpha response. Basar E. (Ed.). En: *EEG-brain dynamics. Relation between EEG and brain evoked potentials*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, NY, Oxford, USA.
- Baskin DS, Hosobuchi Y. (1981). Naloxone reversal of ischaemic neurological deficit in man. *Lancet*. 2: 272-275.
- Baulieu EE. (1991). Neurosteroids: A new function in the brain. *Biol Cell*. 71: 3-10.
- Baulieu EE. (1992). Neurosteroids: An overview. Biggio G, Concas A, Costa E, Eds. En: *GABAergic Synaptic Transmission: Molecular, pharmacological and clinical aspects*. New York. Raven Press. pp. 1-14.
- Beech R, Ratcliffe M, Tilling K, Wolf CH. (1996). Hospital services for stroke care. S European Perspective. *Stroke*. 27: 1958-1964.

- Belelli D, Bolger MB, Gee KW. (1989). Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur J Pharmacol.* 166: 325-329.
- Bleyaert AL, Nemoto EM, Safar P, Stezoski W, Mickel JJ, Moossy J, Rao GR, (1978). Thiopental amelioration of brain damage after global cerebral ischemia in monkeys. *Anesthesiol.* 49: 390-398.
- Block F, Schwarz M. (1998). Global ischemic neuronal damage relates to behavioural deficits: A pharmacological approach. *Neurosci.* 82: 791-803.
- Bokesch PM, Marchand JE, Connelly SC, Wurm H, Kream RM. (1994). Dextromethorphan inhibits ischemia-induced c-fos expression and delayed neuronal death in hippocampal neurons. *Anesthesiol.* 81: 470-477.
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW. (1987). GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neurosci.* 2: 365-383.
- Buchwald JH, Holstein SB, Weber DS. (1973). Multiple unit recording technique, interpretation and experimental application. En: *Bioelectric recording techniques.* Thompson RF, Patterson MM. (Eds.). Academic Press. NY. pp. 201-242.
- Caelles C, Helmberg A, Karin M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.* 370: 220-223.
- Carson F. (1980). Nerve tissue. En: *Theory and practice of histotechnology.* Sheehan DC, Hrapchar BB. (Eds.). The CV Mosby Company. St. Louis Toronto London. pp. 252-266
- Cervantes M, Ruelas R, Sánchez R, Alvarez-Resendíz G. (1989). Brain injury following cardiorespiratory arrest in cats. Effects of Alphaxolone-Alphadolone. *Bol Estud Med Biol., Méx.* 37: 17-27.
- Cervantes M. (1993). Análisis comparativo de la actividad eléctrica de diversas estructuras cerebrales en gatos sometidos a isquemia-anoxia cerebral global aguda, efecto de la nimodipina. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM.
- Cervantes M, Ruelas R, Chavez-Carrillo I, Contreras-Gomez A, Antonio-Ocampo A. (1995). Effects of propofol on alterations of multineuronal activity of limbic and mesencephalic structures and neurological deficit elicited by acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res.* 26: 385-395.

- Chan PH. (1996). Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 27: 1124-1129.
- Choi DW. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*. 7: 369-379.
- Choi DW. (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS*. 11: 465-469.
- Chow E, Haddad GG. (1998). Differential effects of anoxia and glutamate on cultured neocortical neurons. *Exp Neurol*. 150: 52-59.
- Clarke R, Van den Berg HW, Murphy RF. (1990). Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tomosifen and 17 β -estradiol. *J Natn Cancer Inst*. 82: 1702-1705.
- Clavier N, Kirsch JR, Hurn PD, Traystman RJ. (1994). Effects of postischemic hypoperfusion on vasodilatory mechanisms in cats. *Am J Physiol*. 267: H2012-H2018.
- Contreras A. (1994). Análisis electroencefalográfico del sueño en gatos sometidos a isquemia anoxia cerebral global aguda. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas. UNAM.
- Cononaco M, Tavolaro R, Maggi A. (1993). Steroid hormones and receptors of the GABA_A supramolecular complex. II. Progesterone and estrogen inhibitory effects on the chloride ion channel receptor in different forebrain areas of the female rat. *Neuroendocrinol*. 57: 974- 984.
- Copérchot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjövall J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P. (1983). Pregnenolone and its sulphate ester in the rat brain. *Brain Res*. 270: 119-125.
- Costa E, Auta J, Guidotti A, Korneyev A, Romeo E. (1994). The Pharmacology of Neurosteroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 49: 385-389.
- Cottrell JE. (1995). Possible mechanisms of pharmacological neuronal protection. *J Neurosurg Anesthesiol*. 7: 31-37.
- Crain JB, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. (1988). Selective neuronal cell death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: A silver impregnation study. *Neurosci*. 27: 387-402.

- Daniel WW. (1991). Bioestadística (base para el análisis de las ciencias de la salud). Ed. Limusa, 3a. edición. México, D.F.
- Davies MG, Hagen P. (1993). The vascular endothelium. *Annals Surg.* 218: 593-609.
- Dearden NM. (1985). Ischaemic brain. *Lancet.* 2: 255-259.
- Deniau JM, Kitai ST, Donoghue JP, Grofová I. (1982). Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. *Exp Brain Res.* 47: 105-113.
- DeVoogd T, Nottebohm F. (1981). Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science.* 214: 202-204.
- Difiglia M, Aronin N, Leeman SE. (1981). Immunoreactive substance P in the substantia nigra of the monkey: Light and electron microscopic localization. *Brain Res.* 233: 381-388.
- Dunn SM, Botenson AN, Martin IL. (1994). Molecular neurobiology of the GABA_A receptor. En: *International review neurobiol.* 36: 51-93.
- Earnest MP, Yarnel PR, Merrill SL, Knap GL. (1980). Long term survival and neurological status after resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest. *Neurol NY.* 30: 1298-1302.
- Eisenberg MS, Copas MK, Alstrom A. (1980). Management of out-of-hospital cardiac arrest: failure of basic emergence medical technician services. *JAMA.* 243: 1049-1051.
- Fern R, Ransom BR, Waxman SG. (1996). Autoprotective mechanisms in the CNS. *Mol Chem Neuropathol.* 27: 107-129.
- Fisher M, Jones S, Sacco RL. (1994). Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia. *Stroke.* 25: 1075-1089.
- Fonnum F. (1987). Biochemistry, anatomy, and pharmacology of GABA neurons. En: *Psychopharmacology. The third generation of progress.* Meltzer HY. (Ed.). Raven Press, New York. pp. 1873-1882.
- Gee KW, Chang WC, Brinton RE, McEwen BS. (1987). GABA-dependent modulation of the Cl⁻ ionophore by steroids in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 136: 419-423.

- Gee KW, Bolger MB, Brinton RE, Coirini H, McEwen BS. (1988). Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: Structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 246: 803-812.
- Gisvold SE, Safar P, Hendrick HL, Rad G, Moosy J, Alexander H. (1984). Thiopental treatment after global brain ischemia in pigtailed monkeys. *Anesthesiology.* 60: 88-96.
- Giusti L, Belfiore S, Martini C, Lucacchini A. (1992). Sex steroid hormones and GABA_A receptor complex modulation. En: *GABAergic synaptic transmission.* Biggio G, Concas A, Costa E. (Eds.). Raven Press NY. pp. 133-141.
- Graham DI. (1985). The pathology of brain ischaemia and possibilities for therapeutic intervention. *Br J Anaesth.* 57: 3-17.
- Granger CV, Greer DS, Liset E, Coulombe R, O'Brien E. (1978). Measurements of outcomes of care for stroke patients. *Stroke.* 6: 224-228.
- Grofová I, Deniau JM, Kitai ST. (1982). Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP. *J Comp Neurol.* 208: 352-368.
- Guan J, Williams C, Skinner SJ, Mallard C, Gluckman PD. (1996). The effects of insulin like growth factor (IGF)-1, IGF-2 and des-IGF-1 on neuronal loss after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins. *Endocrinology.* 137: 893-898.
- Haber SN, Elde RP. (1982). The distribution of enkephaline immunoreactive fibers and terminals in the monkey central nervous system: An immunohistochemical study. *Neuroscience.* 7: 1049-1095.
- Haddad GG, Jiang C. (1993). O₂ deprivation in the central nervous system: On mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Progr Neurobiol.* 40: 277-318.
- Hajós M, Greenfield SA. (1994). Synaptic connections between pars compacta and pars reticulata neurones: Electrophysiological evidence for functional modules within the substantia nigra. *Brain Res.* 660: 216-224.

- Hall ED, Pazara KE, Braughler JM. (1988). 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke*. 19: 997-1002.
- Hallmayer J, Hossmann A, Mies G. (1985). Low dose of barbiturate for prevention of hippocampal lesion after brief ischemic episode. *Act Neuropathol*. 68: 7-31.
- Hansen AJ, Lundbaek JA. (1989). Ion distributions in brain during ischemia. *J Neurosurg Anesth*. 1: 353-356.
- Hashimoto N, Matsumoto T, Mabe H, Hashitani T, Nishino H. (1994). Dopamine has inhibitory and accelerating effects on ischemia induced neuronal cell damage in the rat striatum. *Brain Res Bull*. 33: 281-284.
- Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL. (1987). Structure-activity relationships for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid_A receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther*. 241: 346-353.
- Hawkinson JE, Kimbrough CL, McCauley LD, Bolger MB, Lan NC, Gee KW. (1994). The neuroactive steroid 3α -hydroxy- 5β -pregnan-20-one is a two-component modulator of ligand binding to the GABA_A receptor. *Eur J Pharmacol*. 269: 157-163.
- Hernández J. (1988). Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En: *Bioquímica e inmunología*. Facultad de Medicina UNAM. Editorial Piensa, SA de CV. México, DF. pp. 447-459.
- Heuser D, Guggenberger H. (1985). Ionic changes in brain ischaemia and alterations produced by drugs. *Br J Anaesth*. 57: 23-33.
- Hill-Venning C, Lambert JJ, Peters JA, Hales TG, Gill C, Callachan H, Sturgess NC. (1992). The action of endogenous and synthetic pregnane steroids on GABA_A receptors. En: *GABAergic Synaptic Transmission*. Biggio G, Concas A, Costa E. (Eds.). Raven Press. New York. pp. 93-99.
- Hoff JT. (1986). Cerebral protection. *Neurosurg*. 65: 571-579.
- Hossmann K-A. (1985). Post-ischemic resuscitation of the brain: selective vulnerability versus global resistance. En: *Molecular mechanisms of ischemic brain damage*. Kogure K, Hossman K-A, Siesjo BK, Welsh FA. (Eds.). Progress in brain research. New York. 63: 3-17.

- Hossmann K-A. (1990). Hemodynamics of postischemic reperfusion of the brain. En: Current neurosurgical practice: Protection of the brain from ischemia. Weinstein PR, Faden AI. (Eds.). Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland USA. pp. 21-36.
- Hu YZ, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. (1987). Neurosteroids: Oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. Proc Natl Acad Sci. 84: 8217-8219.
- Ikeda Y, Long DM. (1990). The molecular basis of brain injury and brain edema: The role of oxygen free radicals. Neurosurg. 21: 1-11.
- Im WB, Blakeman DP, Davis JP, Ayer DE. (1989). Studies on the mechanism of interactions between anesthetic steroids and γ -aminobutyric acid_A receptors. Mol Pharmacol. 37: 429-434.
- Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatz I. (1975). Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. Acta Neuropath (Berl.). 32: 209-223.
- Johansen FF, Diemer NH. (1991). Enhancement of GABA neurotransmission after cerebral ischemia in the rat reduces loss of hippocampal CA1 pyramidal cells. Acta Neurol Scand. 84: 1-6.
- Johansen FF, Christensen T, Jensen MS, Valente E, Jensen CV, Nathan T, Lambert JDC, Diemer NH. (1991). Inhibition in postischemic rat hippocampus: GABA receptors, GABA release, and inhibitory postsynaptic potentials. Exp Brain Res. 84: 529-536.
- Jörgensen BM, Deckert J, Wright DC, Gehlert DR. (1989). Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: An in situ hybridation study. Brain Res. 484: 393-398.
- Jung-Testas I, Yi Hu Z, Baulieu EE, Robel P. (1989). Steroid synthesis in rat brain cell cultures. J Steroid Biochem. 34:511-519.
- Jussofie A. (1993). Brain area specific differences in the effects of neuroactive steroids on the GABA_A receptor complexes following acute treatment with anaesthetically active steroids. Acta Endocrinol. 129: 4780-4785.
- Juurlink BH, Sweeney MI. (1997). Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. Neurosc Biobehav Rev. 1: 121-128.

- Kaplan J, Dimlich RVW, Biroš MH, Hedges J. (1987). Mechanisms of ischemic cerebral injury. *Resuscitation*. 15: 149-169.
- Karavolas HJ, Herf SM. (1971). Conversion of progesterone by rat medial basal hypothalamic tissue to 5 α -pregnane-3,20-dione. *Endocrinology* 89: 940-942.
- Karlsson BR, Stten PA. (1989). Barbiturates for global and focal ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1: 278-283.
- Kawakami N, Kashiwagi S, Kitahara T, Yamashita T, Ito H. (1995). Effects of local administration of basic fibroblast growth factor against neuronal damage caused by transient intracerebral mass lesion in rats. *Brain Res*. 697: 104-111.
- Kawai K, Nitecka L, Ruetzler CA, Nagashima Gidoó F, Mies G, Nowak TS, Saito N, Lohr JM, Klatzo I. (1992). Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 12: 238-249.
- Kempiski O. (1989). Mechanisms of ischemic cerebral damage: The role of glial cells. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1:267-271.
- Kenneth PM. (1994). Effects of γ -aminobutyric acid modulation on neuronal ischemia in rabbits. *Stroke*. 25: 2271-2275.
- Kirino T. (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 239: 57-69.
- Kirino T, Sano K. (1985). Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*. 62: 201-208.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. (1985). Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. En: *Molecular mechanisms of ischemic brain damage*. Kogure K, Hossman KA, Siesjo BK, Welsh FA. (Eds.). *Progress in Brain Res*. New York. 63: 39-58.
- Kirino T, Tamura A, Sano K, (1986). A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. *Stroke*. 17: 455-459.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T, Ninobe M, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Maeda H, Mikoshiba K, Kamada T. (1990). Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience*. 35: 551-558.

- Kochs E, Hoffman EW, Werner Ch, Thomas Ch, Albretch FR, Schulteam EJ, (1992). The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology*. 76: 245-252.
- Kohno K, Otha S, Furuta S, Kumon Y, Sakaki S. (1995). Intraventricular administration of nitric oxide synthase inhibitors prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Neurosc Lett*. 199: 65-68.
- Kogure K, Tanaka J, Araki T. (1988). The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathol*. 9: 145-170.
- Kogure K, Kato H, (1993). Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke*. 24: 2121-2127.
- Korneyev A, Guidotti A, Costa E. (1993). Regional and interspecies differences in brain progesterone metabolism. *J Neurochem*. 61: 2041-2047.
- Koroshetz WJ, Moskowitz MA. (1996). Emerging treatments for stroke in humans. *TIPS*. 17: 227-233.
- Kotila M, Waltimo O, Miemi ML, Laksonen R, Lempinen M. (1984). The profile of recovery from stroke and factors influencing outcome. *Stroke*. 15:1039-1044.
- Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K. (1988). Brain cell death following ischemia and reperfusion: A proposed biochemical sequence. *Crit Care Med*. 16: 714-726.
- Kubli-Garfias C, Cervantes M, Beyer C. (1976). Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flaxedil immobilized cats. *Brain Res*. 114: 71-81.
- Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossman K-A. (1990). Therapeutic window of CA1 neuronal damage defined by an ultrashort-acting barbiturate after brain ischemia in gerbils. *Stroke*. 21: 1489-1493.
- Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossman KA. (1991). Therapeutic window of halothane anesthesia for reversal of delayed neuronal injury in gerbils: Relationship to postischemic motor hyperactivity. *Brain Res*. 563: 33-38.
- Kurtz EM, Segelaud DR, Arnold AP. (1986). Androgen regulation of the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science*. 232: 393-398.

- Lacaille JC, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. (1989). Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. En: The hippocampus: New vistas. Chan-Palay V, Köhler C. (Eds.). New York. Alan R. Liss. pp. 287-305.
- Lan NC, Gee KW, Bolger MB, Chen JS. (1991). Differential response of expressed recombinant human γ -aminobutyric acid_A receptors to neurosteroids. J Neurochem. 57: 1818-1821.
- Leedy MG, Beattie MS, Bresnahan JC. (1987). Testosterone induced synaptic plasticity of synaptic inputs to adult mammalian motoneuron. Brain Res. 424: 386-390.
- Levitan E, Schofield PR, Burt DR, Rhees LM, Wisden W, Köhler M, Fujita N, Rodriguez HF, Stephenson A, Darlison MG, Barnard EA, Seeburg PH. (1988). Structural and functional basis for GABA_A receptor heterogeneity. Nature. 335: 76-79.
- López-Antunez L. (1979). El sistema olfatorio. En: Anatomía funcional del sistema nervioso. López-Antunez L. (Ed.). Editorial Limusa. México. pp. 563-587.
- Lüddens H, Karpf ER, Seeburg PH. (1995). GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiological implications. Neuropharmacol. 34: 245-254.
- Luna LG. (1960). Manual of histologic staining methods of the armed forces. Institute of pathology. New York. McGraw Hill. pp. 185-300.
- Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB. (1996). Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. J Steroid Biochem Molec Biol. 56: 209-219.
- McEwen BS. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. Trends Pharmacol Science. 12: 141-147.
- Mansour TE. (1963). Studies on hea phosphofructokinasa: Purification, inhibition, activation. J. Biol Chem. 238:2285-2292.
- Martini L, Melcangi RC, Maggi R. (1993). Androgen and progesterone metabolism in the central and peripheral nervous system. J Steroid Biochem Molec Biol. 47: 195-205.
- Meldrum B, Evans M, Griffiths I, Simón R. (1985). Ischaemic brain damage. The role of excitatory activity of the calcium entry. Br J Anaesth. 57:44-46.

- Mellon SH. (1994). Neurosteroids: Biochemistry, modes of action and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab.* 78: 1003-1008.
- Mishkin. M, Appenzeller T. (1990). The Anatomy of Memory. En: *The Workings of the brain. Development, memory and perception.* Llinas RR (Ed.). WH Freeman and Company. New York. pp. 88-102.
- Mitani A, Andou Y, Matsuda S, Arai T, Sakanaka M. Kataoka K. (1994). Origin of ischemia-induced glutamate efflux in the CA1 field of the gerbil hippocampus: An in vivo brain microdialysis study. *J Neurochem.* 63: 2152-2164.
- Miyamoto Y, Jinnai K. (1994). The inhibitory input from the substantia nigra to the mediodorsal nucleus neurons projecting to the prefrontal cortex in the cat. *Brain Res.* 649: 313-318.
- Morari M, O'Connor WT, Darvelid M, Ungerstedt U, Bianchi C, Fuxe K. (1996). Functional neuroanatomy of the nigrostriatal and striatonigral pathways as studied with dual probe microdialysis in the awake rat-II. Evidence for striatal N-methyl-D-aspartate receptor regulation of striatonigral GABAergic transmission and motor function. *Neurosci.* 71: 89-97.
- Myerburg RJ, Conde CA, Sung RJ. (1980). Clinical, electrophysiologic, and hemodynamic profile of patients resuscitated from prehospital cardiac arrest. *Am J Cardiol.* 68: 268-576.
- Murakami K, Kondo T, Epstein CL, Chan PH. (1997). Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke.* 28: 1797-1804.
- Nabekura J, Oomure Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A. (1986). Mechanism of rapid effect of 17 β estradiol on medial amygdala neurons. *Science.* 233: 226-228.
- Nadler JV, Vaca KW, White WF, Lynch GS, Cotman CW. (1976). Aspartate and glutamate as possible transmitters of excitatory hippocampal afferentes. *Nature (Lond).* 260: 538-540.
- Nakano S, Kogure K, Fujikura H. (1990). Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience.* 38: 115-124.

- Nakashima K, Todd M, Warner DS. (1995). The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarization: A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital and isoflurane. *Anesthesiology*. 82: 1199-1208.
- Nemoto EM. (1978). Pathogenesis of cerebral ischemia-anoxia. *Crit Care Med*. 6: 203-214.
- Nemoto EM, Erdman W, Strong E, Rad GR, Moosy J. (1979). Regional brain PO₂ after global ischemia in monkeys: Evidence for regional differences in critical perfusion pressures. *Stroke*. 10: 44-51.
- Neumann-Hefelint A, Weissner C, Vogel P. (1994). Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, jun3 and NGF1-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 14: 206-216.
- Nilsson GE, Lutz PL. (1993). Role of GABA in hypoxia tolerance, metabolic depression and hibernation-possible links to neurotransmitter evolution. *Comp Biochem Physiol*. 105C: 329-333.
- Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, Kominami E, Uchiyama Y. (1995). Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci*. 15: 1001-1011.
- Onodera H, Kogure K, Ono Y, Igarashi K, Kiyota Y, Nagooka A, (1989). Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 98: 101-109.
- Orchinik M, McEwen B. (1993). Novel and classical actions of neuroactive steroids. *Neurotransmissions*. 9: 1-6.
- Orrenius S, McCarntey D, Jones D. (1988). Ca²⁺ activated mechanisms in toxicity and programmed cell death. *ISI. Atlas Sci Pharmacol*. 2: 319-324.
- Orrenius S, Burkitt MJ, Kass G. (1992). Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol*. 32: 533-542.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J. (1989). Excitatory and inhibitory amino acids in the hippocampus. En: *The hippocampus. New vistas*. Chan-Palay V, Köhler C. (Eds.). Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 97-117.

- Parent A, Hazrati Lili-Naz. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo cortical loop. *Brain Res Rev.* 20: 91-127.
- Paul SM, Purdy RH. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6: 2311.
- Petit CK, Feldmann E, Pulsinelli WA Plum F. (1987). Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology.* 37: 1281-1286.
- Petterson MM. (1973). Bioelectric recording techniques. Petterson MM. (Ed.). Academic Press. New York. Vol.1A.
- Plum F. (1983). What cause infarction in ischemic brain? *Neurology (NY).* 33: 222-233.
- Poirier LJ, Giguère M, Marchand R. (1983). Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Res Bull.* 11: 371-397.
- Popovici T, Represa A, Crépel V, Barbin G, Beaudoin M, Ben-Ari Y. (1990). Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos like proteins in rat brain. *Brain Res.* 536 :183-194.
- Pulsinelli W, Brierley JB, Plum F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 11: 491-498.
- Pulsinelli W. (1985). Selective neuronal vulnerability: Morphological and molecular characteristics. En: *Molecular mechanisms of ischemic brain damage.* Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds.). Progress in Brain Res. New York. Elsevier. 63: 29-37.
- Pulsinelli W. (1992). Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet.* 339: 533-536.
- Pulsinelli W, Jacewics M, Levy DE, Levy DE, Petit CK, Plum F. (1997). Ischemic brain injury and the therapeutic window. En: *Frontiers of neurology. A symposium in honor of Fred Plum.* Annals of the New York Academy of Sciences. Reis DJ, Posner JB. (Eds.) The New York Academy of Sciences. New York. New York. 835: 187-192.
- Purdy RH, Moore PH, Morrow L, Paul SM. (1992). Neurosteroids and GABA_A receptor function. En: *GABAergic synaptic transmission.* Biggio G, Concias A, Costa E. (Eds.). Raven Press. New York. pp. 87-92.

- Raichle ME. (1983). The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol.* 13: 2-10.
- Raisinghani KH, Dorfman RI, Fornichielli E, Gyermek L, Genter G. (1968). Uptake of intravenously administered progesterone, pregnanedione y pregnanolone by the rat brain. *Acta Endocrinol.* 57: 395-404.
- Reddy AG, Shivaji S, Guota PD. (1989). Effects of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *J Steroid Biochem.* 33: 1229-1233.
- Reiter RJ. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533.
- Rick CE, Lacey MG. (1994). Rat substantia nigra pars reticulata neurons are tonically inhibited via GABA_A, but not GABA_B, receptors in vitro. *Brain Res.* 659: 133-137.
- Robel P, Bourreau E, Corpéchet C, Dang DC, Halberg F, Clarke C, Haug M, Schlegel ML, Synguelakis M, Vourch C, Baulieu EE. (1987). Neuro-steroids: 3 β -hydroxy- Δ 5-derivatives in rat and monkey brain. *J Steroid Biochem.* 27: 649-659.
- Roine RO. (1997). Global cerebral ischemia. En: *Current rev cerebrovascular dis.* Fisher M, Bogouslavsky J. (Eds.). Current Medicine Philadelphia PA. pp. 159-164.
- Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. (1993). Gender influences outcome of brain injury progesterone plays a protective role. *Brain Res.* 607: 333-336.
- Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG. (1994). Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp Neurol.* 129: 64-69.
- Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG (1996). Progesterone rapidly decreases brain edema: Treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol.* 138: 246-251.
- Rupprecht R, Hauser CAE, Trapp T, Holsboer F. (1996). Neurosteroids: Molecular mechanisms of action and psychopharmacological significance. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 56: 163-168.
- Safar P. (1978). Introduction: On the evolution of brain resuscitation. *Crit Care Med.* 6: 199-202.

- Safar P. (1982). Reanimatology: The science of resuscitation. *Crit Care Med.* 10: 134-136.
- Safar P. (1984). Recent advances in cardiopulmonary-cerebral resuscitation: A review. *Ann Emerg Med.* 13: 856-861.
- Saji M, Reis DJ. (1987). Delayed transneuronal death of substantia nigra neurons prevented by γ -aminobutyric acid_A agonist. *Science.* 235: 66-69.
- Saji M, Cohen M, Blau AD, Wessel TC, Volpe BT. (1994). Transient forebrain ischemia induces delayed injury in the substantia nigra reticulata: Degeneration of GABA neurons, compensatory expression of GAD mRNA. *Brain Res.* 643: 234-244.
- Schlaepfer WW, Zimmerman, VJP. (1985). Mechanisms underlying neuronal response to ischemic injury. Calcium activated proteolysis of neurofilaments. En: *Molecular mechanisms of ischemic brain damage.* Kogure K, Hossmann KA, Siesjö, BK, Welsh FA. (Eds.). *Progress in Brain Res, Elsevier Science Publ. Co. New York.* pp. 185-196.
- Schmidt-Kastner R, Grosse Ophoff B, Hossmann K-A. (1990). Pattern of neuronal vulnerability in the cat hippocampus after one hour of global cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 79: 444-455.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 40: 599-636.
- Scheibel AB. (1980). Session chairman's overview: Anatomical and physiological substrates of arousal. En: *The reticular formation revisited: Specifying function for a nonspecific system.* Hobson JA, Brazier MAB. (Eds). *International brain research organization monograph series V 6.* Raven Press. New York. pp. 55-66.
- Schreiber SS, Baudry M. (1995). Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: A role for gene expression? *Trends Neurosci.* 18: 446-451.
- Schumacher M, Coirini H, McEwen BS. (1989). Regulation of high-affinity GABA_A receptors in the dorsal hippocampus by estradiol and progesterone. *Brain Res.* 487: 178-183.
- Schumacher M. (1990). Rapid membrane effects of steroid hormones: An emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13: 359-362.

- Schwartz RD, Huff RA, Yu X, Carter ML, Bishop M. (1994). Postischemic diazepam is neuroprotective in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* 647: 153-160.
- Schwartz RD, Yu X, Katzman MR, Hayden-Hixson DM, Perry JM. (1995). Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum. *J Neurosci.* 15: 529-539.
- Selye H. (1941). Anaesthetic effects of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med.* 46: 116-121.
- Selye H. (1942). Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology.* 30: 437-453.
- Shapiro HM. (1985). Barbiturates in brain ischemia. *Br J Anaest.* 57: 82-95.
- Shingai R, Sutherland ML, Barnard EA. (1991). Effects of subunit types of the cloned GABA_A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmacol.* 206: 77-80.
- Shiu GK, Nemoto EM, Nemmer J. (1983). Dose of thiopental, pentobarbital, and phenytoin for maximal therapeutic effects in cerebral ischemic anoxia. *Crit Care Med.* 11: 452-459.
- Shuaib A, Ijaz S, Hasan S, Kalra J. (1992). Gamma-vinyl GABA prevents hippocampal and substantia nigra reticulata damage in repetitive transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 590: 13-17.
- Shuaib A, Mazagri R, Ijaz S. (1993). GABA agonist "muscimol" is neuroprotective in repetitive transient forebrain ischemia in gerbils. *Exp Neurol.* 123: 284-288.
- Shuaib A, Ijaz S, Kanthan R. (1995). Clomethiazole protects the brain in transient forebrain ischemia when used up to 4 h after the insult. *Neurosci Lett.* 197: 109-112.
- Shuaib A, Breker-Klassen MB (1997). Inhibitory mechanisms in cerebral ischemia: A brief review. *Neurosc Biobehav Rev.* 21: 219-226.
- Siegel S. (1956). *Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences.* New York. McGraw-Hill.
- Siesjö BK, Wieloch T. (1985). Cerebral metabolism in ischaemia: Neurochemical basis for therapy. *Br J Anaest.* 57: 47-52.
- Siesjö BK. (1988). Historical overview: Calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 552: 638-661.

- Siesjö BK, Katsura K, Mellegard P, Ekholm A, Lundgren J, Smith M. (1993). Acidosis-related brain damage. En: Molecular mechanisms of ischemic brain damage. Kogure K, Hossman K-A, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds.). Progress in Brain Research. Elsevier Science Publ. Co., New York. 96: 23-48.
- Siesjö BK, Katsura K, Kristián T. (1995). The biochemical basis of cerebral ischemic damage. J Neurosurg Anesthesiol. 7: 47-52.
- Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Bakers SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Currans T, Morgan JI. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. Nature. 363: 166-169.
- Smith SS, Waterhouse BD, Chapin JK, Woodward DJ. (1987). Progesterone alters GABA and glutamate responsiveness: A possible mechanism for its anxiolytic action. Brain Res. 400: 353-359.
- Smith SS. (1991). Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. Neuroscience. 42: 309-320.
- Snider RS, Niemer WT. (1961). A Stereotaxic atlas of the cat brain. Chicago IL. The University of Chicago Press.
- Snider BD, Ramirez-Lasepas M, Lippert DM. (1977). Neurological status and prognosis after cardiopulmonary arrest. I. A retrospective study. Neurology, 27: 807-811.
- Spencer HJ, Tominez G, Halpen B. (1981). Mass spectrographic analysis of stimulated release of endogenous amino acids from rat hippocampal slices. Brain Res. 212: 194-197.
- Stabenfeldt GH. (1974). Physiologic, pathologic and therapeutic roles of progestins in domestic animals. J Am Vet Med Assoc. 164: 311-319.
- Steller H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. Science. 267: 1445-1449.
- Sternau LL, Lust WD, Ricci AJ, Ratcheson R. (1989). Role for γ -aminobutyric acid in selectively vulnerability in gerbils. Stroke. 20: 281-287.
- Suzuki R, Yamaguchi T, Inaba Y, Wagner HG. (1985). Microphysiology of selectively vulnerable neurons. En: Molecular mechanisms of ischemic brain

- damage. Kogure K, Hossman K-A, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds.). Progress in Brain Research. Elsevier Science Publ. Co., New York. 63: 59-68.
- Tateishi A, Fleischer JE, Drummond JC, Scheller MS, Zornow MH, Grafe MR, Shapiro HM. (1989). Nimodipine does not improve neurologic outcome after 14 minutes of cardiac arrest in cats. *Stroke*. 20: 1044-1050.
 - Tepper JM, Martin LP, Anderson DR. (1995). GABA_A receptor-mediated inhibition of the rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *J Neurosci*. 15: 3092-3103.
 - Thomson CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267: 1456-1462.
 - Todd MM, Chadwick HS, Shapiro HM, Dunlop BJ, Marshall LF, Dueck R. (1982). The neurologic effects of thiopental therapy following experimental cardiac arrest in cats. *Anesthesiology*. 57: 76-87.
 - Trembly B. (1991). Clinical potential for the use of neuroprotective agents. En: *Neuroprotective Agents: Clinical and experimental aspects*. Trembly B, Slikker Jr W. (Eds.). New York. The New York. Academy of sciences. pp. 1-12.
 - Truelove D, Shuaib A, Ijaz S, Richardson S, Kalra J. (1994). Superoxide dismutase, catalase, and U78517F attenuate neuronal damage in gerbils with repeated brief ischemic insults. *Neurochem Res*. 19: 665-671.
 - Tsubokawa H, Oguro K, Robinson HPC, Masuzawa T, Kirino T, Kawai N. (1992). Abnormal Ca²⁺ homeostasis before cell death revealed by whole cell recording of ischemic CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience*. 49: 807-817.
 - Turner DM, Ransom RW, Yang J, Olsen RW. (1989). Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the γ -aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther*. 248: 960-966.
 - Van Huffelen AC, Poortvliet DCJ, Van Der Wulp CJM. (1984). Quantitative electroencephalography in cerebral ischemia. Detection of abnormalities in "normal" EEGs. *Progress in Brain Res*. 62: 3-28.
 - Verhage HG, Beamer NB, Brenner RM. (1976). Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod*. 14: 579-585.

- Verhaegen M, Laizzo PA, Todd MM. (1995). A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on cerebral energy stores at the time ischemic depolarization. *Anesthesiology*. 82: 1209-1215.
- Wagner SR, Lanier WL. (1994). Metabolism of glucose, glycogen, and high-energy phosphates during complete cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 81: 1516-1526.
- Walker PD, Carlock LR. (1993). Immediate early gene activation during the initial phases of the excitotoxic cascade. *J Neurosci Res*. 36: 588-595.
- Warner DS. (1989). Volatile anesthetics and the ischemic brain. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1: 290-294.
- White BC, Aust SD, Arfors KE, Aronson LD. (1984). Brain injury in ischemic-anoxia: Hypothesis extension. A tale of two ions? *Ann Emerg Med*. 13: 862-867.
- White BC, Grossman LI, Krause GS. (1993). Brain injury by global ischemia and reperfusion: A theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*. 43: 1656-1665.
- Wieland S, Lan NC, Mirasedeghi S, Gee KW. (1991). Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Brain Res*. 565: 263-268.
- Wieloch T. (1985). Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability En: Molecular mechanisms of ischemic brain damage. Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds.). *Progress in Brain Research*. Elsevier Science Publ. Co. New York. 63: 69-82.
- Willmer EN. (1961). Steroids and cell surfaces. *Biol Rev*. 36: 368-398.
- Winters WD, Mori K, Spooner CE, Kado RT. (1967). Correlation of reticular and cochlear multiple unit activity with evoked responses during wakefulness and sleep. I. *Electroenceph Clin Neurophysiol*. 23: 539-545.
- Yi Hu Z, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. (1987). Neurosteroids: Oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci*. 84: 8215-8219.