

11232
8
200



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Dr. Manuel Velasco Suárez"

FACULTAD DE MEDICINA
 SET. 28 1993
 SECRETARÍA DE SERVICIOS ESCOLARES
 DEPARTAMENTO DE POSGRADO

ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA EN ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL. MODELO EXPERIMENTAL.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
 DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

E S I S

Que para obtener el Título de

NEUROCIROJANO

representa

Dr. Juan Manuel Miquelajauregui Villegas

Handwritten signature



Director de Tesis:
DR. HUMBERTO MATEOS GOMEZ

México, D. F.

Febrero de 1992

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCION	6
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	13
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS	26

RESUMEN

La enfermedad vascular cerebral isquémica es una causa importante de mortalidad y de incapacidad funcional permanente en países desarrollados, y hasta el momento los recursos terapéuticos han resultado poco satisfactorios. Además de la promoción de medidas preventivas, se realizan grandes esfuerzos por encontrar tratamientos que permitan reducir el daño neuronal una vez que se ha instalado un evento isquémico. Uno de los mecanismos finales de lesión celular es la entrada abrupta de calcio mediada por canales dependientes de voltaje o por receptores NMDA al interior celular, que conlleva a la destrucción de las membranas y el citoesqueleto. En este campo, la posible utilización de fármacos que bloqueen los canales de calcio ha sido prometedora.

En este estudio, se decidió probar la utilidad terapéutica de un bloqueador no competitivo del receptor NMDA (MK-801, 2 mg/kg intraperitoneal), para reducir la extensión del daño neuronal en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en rata. El MK-801 se administró 10 minutos antes y 1 hora después de la oclusión y los resultados se compararon con un grupo control (oclusión sin medicamento).

Encontramos que la administración de MK-801 redujo signifi-

cativamente el área de infarto en relación al grupo control ($p < 0.05$), con una mayor efectividad cuando se administra de forma profiláctica (10 minutos antes de la oclusión). Sin embargo, encontramos que las ratas tratadas con este fármaco presentaron mayor deterioro neurológico post-oclusión que el grupo control, en relación quizás a una interacción del MK-801 con el anestésico empleado (hidrato de cloral).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el MK-801 puede ser efectivo en la prevención de daño neurológico post-isquémico, y que su mayor efectividad se presenta cuando se administra de forma profiláctica o inmediatamente después de instalado un evento isquémico focal, sin embargo, antes de recomendar su aplicación clínica, deberán definirse sus posibles efectos colaterales.

INTRODUCCION

La enfermedad vascular cerebral (EVC), después de las enfermedades cardíacas y el Cáncer, ocupa el tercer lugar como causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados. Cada año se registran alrededor de 85,000 ó más muertes en los Estados Unidos y casi un millón de personas logran sobrevivir al ataque sufriendo secuelas, muchas de ellas incapacitantes. A pesar de que la incidencia de la EVC ha ido disminuyendo en los últimos 30 años, todavía se constituye como un problema importante de salud pública con un alto costo social (1).

Hace aproximadamente 10 años, se propuso que la necrosis neuronal en la isquemia, hipoglicemia, y el status epiléptico se encontraba íntimamente relacionada con la entrada de calcio al interior de neuronas que son selectivamente vulnerables debido a que poseen una alta densidad de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y de aminoácidos excitatorios (AAE). Se demostró que la pérdida de la homeostasis del calcio conduce a daño celular debido a una lipólisis y proteólisis incontroladas, las cuales causan daño a la membrana plasmática y degradación del citoesqueleto (3,4,12). Un mecanismo importante que determina la entrada exagerada de calcio al interior celular está condicionado por la activación de canales de calcio operados por agonistas,

notablemente por el L-glutamato y otros AAE relacionados. Aunque los AAE pueden también dañar a la célula a través de una entrada anormal de sodio y cloro, con su efecto osmótico concomitante, existe acuerdo en que la mayor parte del daño celular se encuentra condicionado por el calcio (3,16).

El calcio normalmente entra a la célula a través de uno de los tres tipos de canales de calcio (designados como L,T y N), ó a través de canales en los receptores a L-glutamato que también son de tres tipos, a saber, los activados por N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (K) y AMPA (A) (marty,cotman). Los receptores a kainato y AMPA (también conocidos como no-NMDA), son permeables principalmente a cationes monovalentes (Na+, K+ e H+), mientras que el canal regulado por NMDA lo es al calcio. El receptor NMDA es bloqueado por algunos antagonistas competitivos, mientras que el canal asociado al receptor es bloqueado por el magnesio y otros antagonistas no-competitivos como la ketamina, fenciclidina, y compuestos como el MK-801 (dizocilpina) (11,13). La hipótesis excitotóxica del daño neuronal asociado al calcio se apoya en resultados que han demostrado que los antagonistas competitivos y no-competitivos del receptor NMDA son capaces de reducir el tamaño de infartos experimentales causados por isquemia focal (7,13).

De acuerdo a esta hipótesis, el daño celular puede ser preve-

nido por: 1) Bloqueo de la activación del receptor a glutamato, 2) aumento de la actividad de neurotransmisores inhibitorios, 3) bloqueo de la entrada de calcio al interior celular, 4) inhibición de la actividad de la proteína kinasa C y 5) protección en contra del daño celular.

En este trabajo, se decidió comprobar la utilidad del MK-801 (un antagonista no competitivo del receptor NMDA), para reducir el tamaño de infartos producidos experimentalmente en un nuevo modelo de oclusión de la arteria cerebral media (ACM) en rata, en comparación con un grupo control.

MATERIAL Y METODOS

20 ratas adultas tipo Wistar con un peso promedio entre 230-320 gr se mantuvieron a temperatura ambiente que osciló entre los 22-26°C, con 50% de humedad y bajo ciclo sueño vigilia de aproximadamente 12 hr. Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua. Todas fueron anestesiadas con hidrato de cloral a una dosis de 200 mg/kg bajo respiración espontánea. Se canalizó la arteria ventral de la cola de la rata para monitoreo continuo de la presión arterial media (PAM). Se tomaron muestras repetidas de sangre a través de esta vía para medición seriada de pH, hematócrito, y glicemia. Se ocluyó la ACM utilizando el método descrito por Zea Longa (18,15) modificado por Kawamura et. al. (8-10). En resumen, este método consiste en el aislamiento de la arteria carótida externa (ACE) izquierda a través de una incisión ventral medial en el cuello de la rata. Se identifican la arteria tiroidea superior y occipital de la ACE, se coagulan y se cortan. La única rama de la arteria carótida interna (ACI) extracraneal, la arteria pterigopalatina fué igualmente disecada y aislada. El origen de la arteria pterigopalatina fué ocluido con un clip microvascular de tal manera que la sutura intraluminal de nylon empleada para ocluir la ACM no fuera erróneamente introducida en este vaso. Una de las modificaciones a la técnica original fué disecar la arteria pterigopalatina sin necesidad de seccionar el

músculo estilohiideo. Posteriormente la ACE fue ocluida con una doble ligadura de seda 6-0 y seccionada para formar un muñón arterial. A través de este muñón se introdujo una sutura de nylon 3-0 de 20 mm de longitud que había sido previamente redondeada en uno de sus extremos con una lija fina. Se introdujeron aproximadamente 17.5 mm de la sutura a través de la ACI extracraneal hasta llegar a sentir una ligera resistencia, indicando que la punta de la sutura había llegado a la arteria cerebral anterior y que la arteria cerebral media había sido ocluida en su origen. De esta manera, el flujo sanguíneo hacia la ACM proveniente de la ACI, la arteria cerebral anterior y la arteria cerebral posterior fue bloqueado a nivel del polígono de Willis.

El MK-801 se disolvió en solución salina a una concentración final de 3 mg/ml. La dosis administrada fue de 2 mg/kg de peso intraperitoneal. Las ratas fueron divididas en 4 grupos: grupo 1, control (sham operation). Grupo 2, oclusión de la ACM sin empleo de neuroprotectores. Grupo 3, oclusión de la ACM con administración de MK-801 diez minutos antes de la oclusión. Grupo 4, oclusión de la ACM y administración de MK-801 una hora después de la oclusión. Todas las ratas fueron exploradas neurológicamente a las 8 y 24 hr. La severidad del deficit motor fue clasificada en 4 grados de acuerdo a Bederson et. al. (2); grado 0, no deficit observable; grado 1, extremidad anterior en flexión; grado 2,

disminución de la resistencia al desplazamiento lateral; grado 3, marcha en círculo hacia el lado parético (lateropulsión) (figura 1).

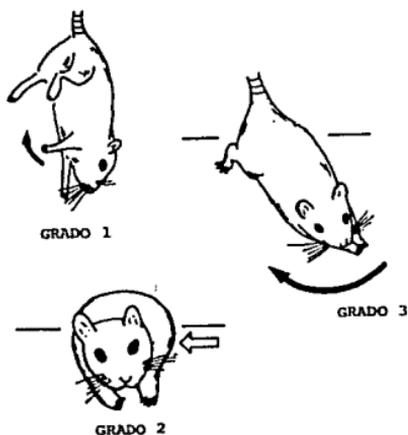


FIGURA 1. Exploración neurológica,
(ver descripción en el texto).

24 hr después de la oclusión de la ACM, las ratas fueron nuevamente anestesiadas con la misma dosis de hidrato de cloral, se expuso el corazón mediante una toracotomía para insertar una cánula en la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo. La arteria aorta abdominal se ocluyó y se practicó una incisión en la aurícula derecha. La fijación por perfusión se llevó a cabo

con formalina al 10% para inmediatamente después extraer el encéfalo y depositarlo en formalina a la misma concentración para su estudio histopatológico. El cerebro se incluyó en parafina y se realizaron secciones coronales con un grosor de 5 micras para ser teñidas con hematoxilina y eosina. El área fue medida en una sección coronal a 6 mm del polo frontal. Las áreas de infarto fueron medidas utilizando un programa de digitalización de imágenes (Targa truevision, IBM). El área de infarto fue calculada mediante un programa de computación que utiliza integración numérica de las áreas infartadas en el corte coronal con un factor de conversión de pixels a milímetros. El área de infarto se expresó como un porcentaje del área cerebral total del corte seleccionado y en términos absolutos en mm cuadrados.

Se calculó la media, desviación estándar y error estándar de todos los datos. Se realizó un análisis de varianza a través del método de ANOVA y la comparación intergrupala mediante la prueba T de Student. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En todos los grupos la PAM permaneció dentro de límites normales durante el procedimiento. En las ratas en las cuales se midió pH, glicemia y hematocrito, no se registraron cambios. Algunas ratas desarrollaron una hipercapnia leve durante la anestesia.

Exploración neurológica

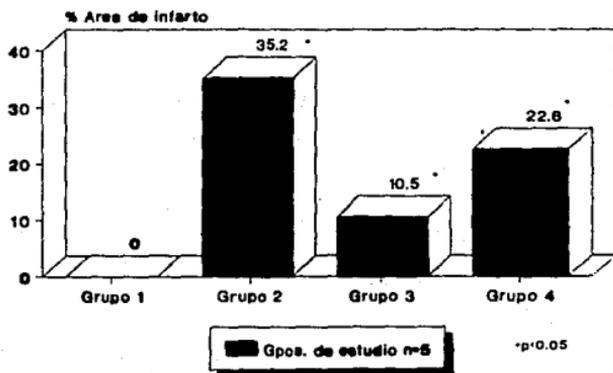
La exploración neurológica en el grupo 1 fue normal en todas las ratas. En el grupo 2, a las 8 hr fue grado 2 en una rata y grado 3 en cuatro. A las 24 hr, dos ratas permanecieron en grado 3 y tres en grado 2. En los grupos 3 y 4 el total de animales permanecieron en grado 3 a las 8 y 24 hr, e inclusive algunas de ellas presentaron aspecto moribundo.

Tamaño del infarto

El tamaño del infarto en milímetros cuadrados y su valor porcentual para todos los grupos se expresan en la figura 2. Existió un patrón consistente de daño isquémico, y ejemplos típicos de infartos en los grupos 2-4 se muestran en la figura 3. En el grupo 1 (operación simulada), no se presentaron en ninguna de las ratas áreas de infarto. En el grupo 2, la media y DS del área total de infarto fue de 46.1 ± 7.3 mm² con un porcentaje de $35.26 \pm 7.3\%$. En el grupo 3, la media y DS del área total fue de $5.3 \pm$

3.3 con un porcentaje de $10.5 \pm 6.8\%$. En el grupo 4 la media y DS del área de infarto fue de $14.4 \pm 4.9 \text{ mm}^2$ con un porcentaje de $22.6 \pm 4.8\%$. La reducción del área de infarto fue mayor en el grupo 3 y en el grupo 4 en comparación al grupo 2 ($p < 0.05$), sin embargo, también existió una diferencia significativa en el efecto terapéutico del MK-801 cuando se administró antes o una hora después de la oclusión ($p < 0.05$).

OCLUSION DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA EFECTO TERAPEUTICO DEL MK-801



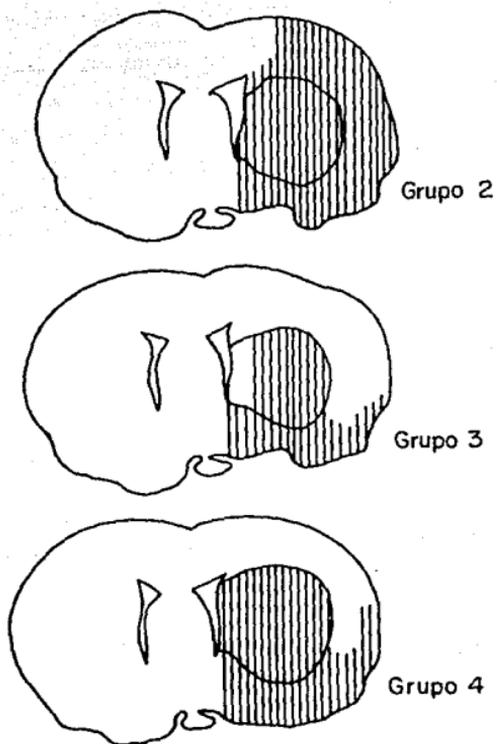


FIGURA 3. Ejemplos típicos de la extensión del área de infarto en los diferentes grupos de estudio (ver texto para descripción de los grupos).

DISCUSION

La EVC isquémica es una causa importante de mortalidad e incapacidad funcional en los países industrializados, sin embargo hasta el momento los resultados terapéuticos han sido decepcionantes. Los mayores progresos han sido realizados en la prevención de los eventos vasculares isquémicos, principalmente a través del control de la hipertensión arterial y de la isquemia cerebral producida por causas cardíacas (1). Aún cuando se reconoce que la prevención es el factor más importante para disminuir la incidencia de este tipo de padecimientos, se llevan a cabo grandes esfuerzos para reducir, una vez que ha ocurrido un evento isquémico, las consecuencias del mismo.

La supresión del aporte circulatorio en un tronco vascular determinado produce una lesión con dimensiones variables en un territorio que se encuentra definido por la topografía vascular. Esta lesión sufre un proceso evolutivo en horas, días y semanas que permiten su caracterización histopatológica. Por otra parte, las evidencias experimentales sugieren que la muerte neuronal es causada por una activación descontrolada de receptores al L-glutamato. Este AAE activa al receptor NMDA que a su vez produce un daño excitotóxico de naturaleza post-sináptica que se relaciona con el calcio y el sodio. El calcio citosólico activa varias enzimas proteolíticas que terminan con la destrucción celular

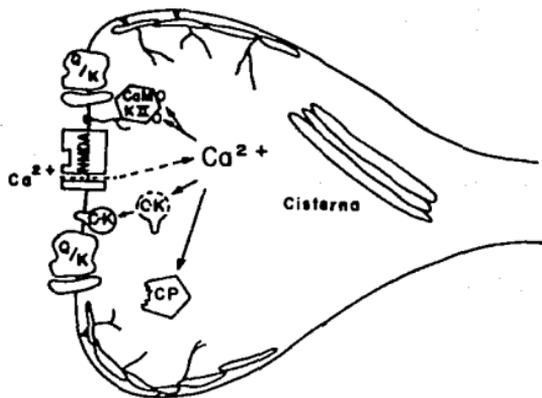


FIGURA 4. Diagrama esquemático de las proteínas que pueden ser activadas por calcio. Abreviaciones: Q/K, receptor quisqualato/kainato; CaMKII, calmodulina.. quinasa dependiente de calcio; NMDA, receptor NMDA; CP, calpaína; CK, proteína quinasa C.

(3,12,14) (figura 4). Este mecanismo citotóxico ha sido propuesto también para otro tipo de enfermedades no isquémicas tales como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida entre otras (3). En base a lo anterior, recientemente se ha incrementado el interés en la posible aplicación terapéutica de antagonistas de los AEE. En particular, evidencia derivada de estudios animales han indicado que antagonistas del receptor NMDA poseen propiedades anticonvulsivantes y ansiolíticas, con un efecto preventivo sobre la degeneración neuronal causada por la isquemia, anoxia, hipoglicemia y

neurotoxinas endógenas (6,7,11,13). Como agentes terapéuticos, los antagonistas no competitivos NMDA son compuestos lipofílicos que rápidamente penetran al sistema nervioso central, a diferencia de los antagonistas competitivos disponibles. De estos antagonistas no competitivos, el más potente de ellos hasta ahora conocido es el MK-801 (dizocilpina) (figura 5), y su utilidad ha sido demostrada en algunos modelos de isquemia focal (5,11).

Un aspecto importante de los estudios sobre daño isquémico ha sido determinar si es posible definir el efecto terapéutico de las drogas empleadas, aún cuando se apliquen algunas horas después de ocurrido un episodio de isquemia, ya que esta situación es muy común en la práctica clínica debido al tiempo que transcurre entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento. En base a lo anterior, decidimos probar la utilidad del MK-801 cuando se administró antes y una hora después de la oclusión experimental de la ACM en rata.

Resultados terapéuticos

En el modelo empleado en este estudio, la oclusión intraluminal de la ACM produjo un infarto masivo del tejido cerebral en el lado ocluido, que en promedio para el grupo 2 (grupo sin tratamiento) fue de 35.2% de la superficie total del corte. La administración del MK-801 (2 mg/kg i.p.) 10 minutos antes de la oclusión fue capaz de producir una reducción importante en el área total

de infarto en un 65% en comparación al grupo sin tratamiento ($p < 0.05$). Este grado de neuroprotección había sido previamente publicado en casos de administración pre-oclusión (7). Por otra parte, la administración de este fármaco una hora después de la oclusión produjo una disminución del infarto en un 35% en comparación al grupo sin tratamiento ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que el uso de antagonistas NMDA pueden ser de valor terapéutico en isquemia focal, incluyendo a la EVC en humanos, principalmente dentro de la primera hora de instalada la isquemia. Nuestros resultados sugieren que el MK-801 (2 mg/kg i.p.) puede ser efectivo cuando se administra una hora después de la oclusión vascular. Esta situación, aunque difícil en la práctica clínica (X), pudiera ser de utilidad práctica en estados de isquemia aguda intrahospitalaria (procedimientos endovasculares, oclusión vascular intraoperatoria, etc.). El mecanismo de acción más probable del MK-801 es el rescate de las zonas de "penumbra" en la región del infarto para proteger en contra del daño causado por exceso de activación de los mecanismos del glutamato (figura 6) (5). Queda por determinar en estudios posteriores la totalidad de la "ventana terapéutica" de este fármaco para su posible utilidad en etapas más tardías de la isquemia, sin embargo, es una realidad que hasta el momento no existe ningún fármaco reconocido que brinde una neuroprotección si se aplica después de 5 hr de haberse instalado un evento isquémico cerebral focal (5,17).

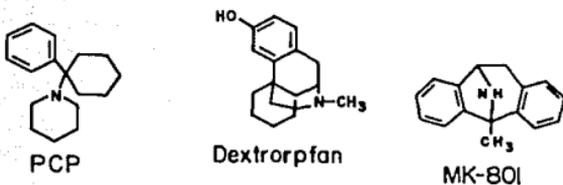


FIGURA 5. Estructura de algunos antagonistas no-competitivos del receptor NMDA.

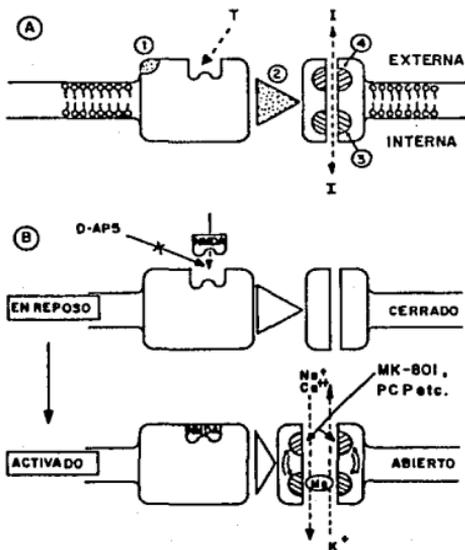


FIGURA 6. Receptor NMDA y sus probables sitios de bloqueo por antagonistas competitivos y no-competitivos.

En estos casos habría que considerar el valor terapéutico de la perfusión transvenosa retrógrada para poder hacer llegar un fármaco a las áreas isquémicas (19).

Evaluación neurológica

La evaluación neurológica en las ratas nos permitió valorar indirectamente el impacto clínico del infarto y en cierta manera, los efectos colaterales del MK-801. En este estudio, encontramos que en el grupo sin medicamento la valoración realizada 8 hr después de la oclusión, mostró en la mayoría de los casos un grado 3 con tendencia a evolucionar a un grado 2 dentro de las primeras 24 hr, sin embargo, en los grupos 3 y 4 (tratados con MK-801), la exploración neurológica mostró un grado 3 en todas las ratas sin tendencia a la mejoría neurológica, es decir que a pesar de que hubo una reducción objetiva de las áreas de infarto, este efecto terapéutico no se correlacionó con mejores condiciones neurológicas. La causa de este fenómeno hasta el momento no tiene una explicación satisfactoria, y no había sido reportado anteriormente. Una causa probable podría ser la interacción del MK-801 con el anestésico empleado (hidrato de cloral), sin embargo la comprobación de tal interacción requiere de estudios experimentales adicionales.

En resumen, los resultados obtenidos en este modelo experimental con el empleo del MK-801 apoyan la hipótesis de que los

receptores NMDA juegan un papel importante en la degeneración neuronal inducida por isquemia. La habilidad de este antagonista cuando se administra por vía periférica para prevenir el daño neuronal, aún cuando se realice después de instalado un episodio isquémico, sugiere el uso potencial de este compuesto en el tratamiento de la EVC isquémica humana.

CONCLUSIONES

1. El MK-801 (dizolcipina) es capaz de reducir el daño isquémico neuronal producido por la oclusión experimental de la ACM en rata cuando se administra antes y una hora después de la oclusión.
2. El efecto terapéutico obtenido (a través de la evaluación histopatológica) no se correlacionó con una mejoría en la valoración neurológica a las 8 y 24 hr a partir de la oclusión, sin embargo, la corroboración de este punto requiere de estudios adicionales.
3. Debido a los resultados consistentes en la producción de áreas de infarto con el modelo experimental utilizado, nos permite proponerlo en la evaluación de diversos parámetros (bioquímicos, histopatológicos, etc.) asociados a la EVC isquémica.

REFERENCIAS

1. Barinagarrementeria F. **Enfermedad Vascular Cerebral**. Mexico, Ediciones Instituto Syntex, 1991.
2. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke** 17:472-476, 1986.
3. Choi D.W. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **TINS** 11:465-469, 1988.
4. Cotman CW, Iversen L. Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. **TINS** 10:263-265, 1987.
5. Foster AC, Gill R, Kemp JA, Woodruff GN. Systemic administration of MK-801 prevents NMDA-induced neuronal degeneration in rat brain. **Neuroscience Letters** 76:307, 1987.
6. Herring PL. Clinical implications of NMDA receptors. In: Watkins JC, Collingridge GL (eds.) **The NMDA Receptor**. University Press, 1989, pp. 177-185.

7. Iversen LL, Woodruff GN, Kemp JA, Foster AC, McKernan R, Gill R, Wong EHF. Non-competitive NMDA antagonists as drugs. In: Watkins JC, Collingridge GL (eds.) *The NMDA Receptor*. University Press, 1989, pp. 217-226.
8. Kawamura S, Shirasawa M, Fukasawa H, Yasui N. Attenuated neuropathology by nivaldipine after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 22:51-55, 1991.
9. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H. Effects of hyperbaric oxygenation on experimental acute cerebral ischemia. *Journal of Hyperbaric Medicine*. 5:111-123, 1990.
10. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H. Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation on acute focal cerebral ischemia in rats. *Burg Neurol* 31:203-208, 1989.
11. Kemp JA, Foster AC, Wong EHF. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *TINS* 10:274-278, 1987.
12. Kennedy MB. Regulation of neuronal function by calcium. *TINS* 12:417-424, 1987.

13. Meldrum BS, Chapman AG, Patel S, Swan J. Competitive NMDA antagonist as drugs. In: Watkins JC, Collingridge GL (eds.) **The NMDA receptor**. University Press, 1989, pp. 207-215.

14. Miller R. Multiple calcium channels and neuronal function. **Science** 235:46-52, 1987.

15. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. **Stroke** 20:1037-1043, 1989.

16. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. **TINS** 10:299-310, 1987.

17. Woodruff GN, Foster AC, Gill R, Kemp JA, Wong EHF, Iverson LL. The interaction between MK-801 and receptors for NMDA: functional consequences. **Neuropharmacol** 26:903, 1987,

18. Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummings R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke** 20:84-91, 1989.