

03068



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del  
Colegio de Ciencias y Humanidades  
Centro de Neurobiología

Facultad de Medicina

**Alteraciones en la inhibición recurrente y en la citoarquitectura  
del hipocampo en un modelo de isquemia-hipoxia.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

Presenta

**Lic. Enf. María Estela López Hernández**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Hugo José Solís Ortiz**

México, D.F. 1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMIA**

**LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA**

**ASESOR Y DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. HUGO JOSE SOLIS ORTIZ.**

**Para realizar los estudios de Maestría en Ciencias Fisiológicas y la presente tesis, el CONACYT otorgó una Beca Crédito Total con registro No. 83600, a partir del 1o. de Enero de 1993 hasta el 31 de Septiembre de 1994, con extensión de 6 meses.**

**Este proyecto fue apoyado parcialmente por la DGAPA clave IN214296**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Hugo Solís por sus enseñanzas y paciencia como maestro, su dirección como tutor y jefe y sobre todo por su grandeza como persona y amigo.**

**A los maestros en ciencias Leticia Parra Gámez y Jorge Bravo Martínez por compartir sus conocimientos, orientarme y ayudarme siempre, con excelente disposición en las diversas áreas que implica el desarrollo de un trabajo como éste.**

**Al Sr. Alejandro García Hidalgo por su buena disposición para elaborar mediante el uso de la computadora las figuras que ilustran este trabajo, así como por su asistencia técnica.**

**Al Ing. Ascensión Ortíz Espinosa por su asesoría y buena disposición para el buen funcionamiento del equipo biomédico y electrónico utilizado en este trabajo.**

**A la pasante de medicina Matilde Rocío Flores Carrillo por su participación en este trabajo.**

**Al Sr. Mauricio Zárate Parra por la elaboración del material fotográfico.**

**Al Lic. José Luis Rubio por su apoyo en lo que respecta a la informática médica..**

**A los miembros del jurado: Dr. Miguel Cervantes, Dr. Alfonso Escobar, Dr. Roberto Prado y Dr. Manuel Salas por sus valiosas observaciones y comentarios para el mejor desarrollo de este trabajo.**

**Al Dr. Gabriel Corkidi por permitirme iniciar el análisis morfométrico de este trabajo en su laboratorio del Centro de Instrumentos.**

**Al Dr. Joaquín Reyes Téllez-Girón por su constante apoyo para la realización de este trabajo, así como a sus secretarías Magdalena López y Concepción González por su buena disposición para facilitarme el material y equipo que está a su cargo.**

**Al CONACyT por la beca que me otorgó para realizar los estudios de maestría.**

**Al Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la UNAM y a todas las personas que de alguna manera otorgaron facilidades para la realización de este trabajo.**

**A mi madre por estar conigo en todo momento**

**A mis hermanos Enrique, Silvia, Gustavo Adolfo, Patricia y Juan Carlos por su apoyo y comprensión.**

**A mi cuñado y cuñadas por su cariño y ayuda.**

**A mis sobrinos y sobrinas por su alegría**

**A mi padre**

# INDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>1.1 Isquemia Cerebral</b> .....	3
1.1.1 Aspectos generales .....	3
1.1.2 Clasificación .....	8
1.1.3 Alteraciones secundarias a la isquemia cerebral .....	9
1.1.3.1 Alteraciones metabólicas y electrofisiológicas .....	10
1.1.3.2 Alteraciones morfológicas y funcionales .....	26
1.1.4 Alteraciones secundarias a la reperfusión .....	31
1.1.5 Vulnerabilidad selectiva .....	37
<b>1.2 Hipocampo</b> .....	39
1.2.1 Generalidades y organización anatómica .....	39
1.2.2 Citoarquitectura y electrofisiología .....	45
1.2.3 Conexiones (aférens, eferencias y circuito básico) .....	54
1.2.4 Neuroquímica, neurotransmisores y neuromoduladores .....	57
1.2.5 Inhibición recurrente en el hipocampo .....	61
<b>2. Antecedentes</b> .....	65
2.1 Hipocampo e isquemia .....	65
<b>3. Hipótesis</b> .....	75
<b>4. Objetivos</b> .....	76
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	77
5.1 Animales .....	77
5.2 Técnica experimental .....	77
5.2.1 Técnica quirúrgica para isquemia focal transitoria .....	77
5.2.1.1 Grupo de ratas agudas .....	77
5.2.1.2 Grupo de ratas recuperadas .....	79
5.2.2 Variaciones en el flujo sanguíneo cerebral por la oclusión de ambas arterias carótidas comunes .....	79
5.2.3 Registro electrofisiológico .....	79
5.2.3.1 Grupo de ratas agudas .....	79
5.2.3.2 Grupo de ratas recuperadas .....	82
5.3 Procedimiento histológico .....	84
5.4 Análisis morfométrico .....	84
<b>6. Resultados</b> .....	87
6.1 Variaciones en el flujo sanguíneo cerebral .....	87
6.2 Electrofisiología .....	92
6.3 Histología .....	97
6.3.1 Histología del hipocampo isquémico .....	97
6.3.1.1 Isquemia aguda .....	99
6.3.1.2 Isquemia con recuperación de 7 días .....	103

<b>6.4 Electrofisiología y morfometría del giro dentado izquierdo</b> . . . . .	<b>103</b>
<b>7. Discusión</b> . . . . .	<b>107</b>
<b>Conclusiones</b> . . . . .	<b>111</b>
<b>8. Referencias bibliográficas</b> . . . . .	<b>113</b>

## RESUMEN

Se tiene evidencia de que las neuronas piramidales del hipocampo (principalmente las del CA1) son altamente vulnerables a la isquemia y muestran alteraciones funcionales y morfológicas después de un período de isquemia cerebral. Dicha vulnerabilidad puede explicarse por el fenómeno de excitotoxicidad y por el compromiso vascular que probablemente ocurre durante el período de reperfusión debido a los cambios asociados con isquemia y reperfusión. En el presente trabajo se desarrolló un paradigma de isquemia focal transitoria aguda y con recuperación de 7 días, mediante la oclusión de las arterias carótidas comunes con el fin de evaluar los cambios en la inhibición recurrente y las alteraciones en la densidad neuronal del hipocampo de ratas. A través del registro del potencial provocado por la aplicación de estímulos pares en la corteza entorrinal se valoró la inhibición recurrente. El grado de inhibición recurrente se cuantificó mediante el índice de máxima inhibición (IMI) que se definió como la razón de la amplitud del potencial neuronal del segundo potencial provocado= $PN(T)$  sobre la amplitud del potencial neuronal del primer potencial provocado= $PN(C)$ . Donde  $PN(T)$  es el potencial prueba y  $PN(C)$  es el condicionante. Después de sacrificar a los animales y darle el tratamiento adecuado al tejido cerebral, se incluyó en parafina, se realizaron cortes coronales seriados y se tiñeron con las técnicas de Nissl y Klüver-Barrera. La cuantificación celular se realizó a través de un sistema de procesamiento digital de imágenes (IMAGENIA-2000). Se observó aumento en la amplitud del segundo componente del segundo potencial provocado. Al calcular el IMI resultó mayor que 1, lo que sugiere que el daño neuronal causado por el período de isquemia focal transitoria aguda y con recuperación de 7 días determina cambios en la actividad eléctrica del hipocampo. El análisis morfométrico de los datos mostró que la vulnerabilidad del hipocampo a la isquemia aguda se obtuvo con el período de isquemia de 10 y 15 minutos en el CA4 y con el período de 20 minutos en el giro dentado, CA1 y CA3, mientras que en la isquemia con recuperación de 7 días se observaron cambios significativos en el grupo de 10 minutos en el campo CA3 y en CA4 en el grupo de 15 minutos. El campo CA1 fue el que mostró la mayor disminución de la densidad neuronal en el período de 20 minutos. Estos resultados sugieren que la isquemia focal transitoria tanto aguda como con recuperación de 7 días provocó modificaciones en la densidad neuronal del hipocampo. Dicho daño induce alteraciones irreversibles que condicionan la aparición de cambios en la excitabilidad neuronal que pueden explicarse por un fenómeno de desinhibición debido muy posiblemente a la lesión de neuronas inhibitorias.

## SUMMARY

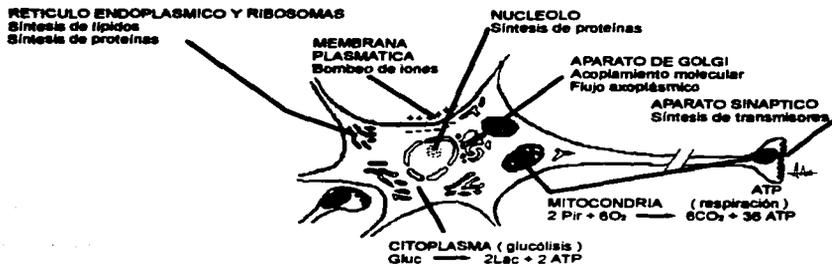
There is evidence that pyramidal neurons of hippocampus exhibit the highest sensitivity of ischemia and show functional and morphological alterations after a cerebral ischemia period. This vulnerability could be due to the excitotoxic effect and to the vascular changes that take place during the reperfusion period after the ischemia. The present study was designed to examine the changes in recurrent inhibition and morphological neuronal density alterations in the rat hippocampus following acute transient focal ischemia of 5, 10, 15 or 20 minutes and after 7 days of survival period. The ischemia was produced by bilateral carotid artery occlusion. Paired-pulse technique was used to study recurrent inhibition. The recurrent inhibition in the hippocampus was assessed by calculating the ratio  $(PS(T)/PS(C))$ : IMI= index of maximal inhibition) of the amplitude of the second (test) population spike [PS(T)] to that of the first (conditioning) population spike [PS(C)]. The animals were sacrificed and the brain was embedded in paraplast, subserially sectioned and stained with Nissl and Kloüver-Barrera technique. The total number of neurons and the qualitative alterations were evaluated by observation of digitized images by means of the IMAGENIA-2000 software (Biocom). The amplitude of the second population spike [PS(T)] was increased (IMI>1.0). The morphometric analysis showed decrease in neuronal density in the groups of 10 and 15 minutes period of acute ischemia in the CA4 and with the 20 minutes period the gyrus dentate, CA1 and CA3. After seven days of recovery period the significant changes were observed in area CA3 after 10 minutes of ischemia. Also changes were observed in CA4 after 15 minutes of ischemia. The CA1 was the region where the period of 20 minutes of ischemia after 7 days of survival provoked a significant decrease in neuronal density. These results suggest that the changes in neuronal excitability observed after the ischemia could be related to a disinhibition mechanism due to inhibitory interneurons lesion.

# INTRODUCCION

## Isquemia Cerebral

### 1.1.1. Aspectos generales

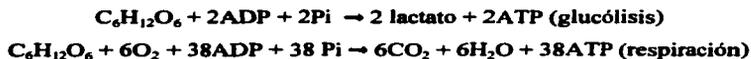
La actividad cerebral mental y sensitivomotora está íntimamente relacionada al metabolismo cerebral, de manera que el deterioro neuroquímico o la insuficiencia metabólica por cualquier causa es capaz de producir anomalías neurológicas de evolución rápida. Las neuronas y las células de la glía llevan a cabo muchos procesos químicos al desarrollar sus funciones básicas especializadas. Entre estas funciones están: el mantenimiento continuo del potencial de membrana por parte de las células nerviosas, así como la síntesis y almacenamiento de transmisores, la elaboración de axoplasma y el reemplazo de sus componentes estructurales caducos (figura No. 1) (Plum y Posner, 1982). Las células de la oligodendroglía como mínimo generan mielina y los astrocitos protoplasmáticos regulan la mayor parte de la homeostasia iónica del líquido extracelular; los astrocitos también realizan una gran variedad de funciones aún no conocidas por completo pero que mantienen el balance metabólico y nutricional de las neuronas. Todas estas actividades complejas requieren energía, de hecho mucho más por kilogramo de peso de células que en cualquier otro órgano del cuerpo. Más aún, muchas de las reacciones enzimáticas tanto de las neuronas como de las células de la glía, así como del endotelio capilar cerebral especializado, deben ser catalizadas en algún punto por la hidrólisis generadora de energía del trifosfato de adenosina (ATP) hacia el difosfato de adenosina (ADP) y el fosfato inorgánico (Pi). Por lo tanto, sin un constante y generoso aporte de ATP, la síntesis celular se hace lenta o se detiene, las funciones neuronales declinan o cesan y las estructuras celulares se desintegran rápidamente (Plum et al., 1982; Krause, White, Aust, Nayini y Kumar, 1988; Gutiérrez, 1991; Navarro, 1991; Lutz y Nilsson, 1994).



Dentro	Flujo sanguíneo cerebral	Fuera
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> 90 mm Hg	55 ml de sangre / 100 gr/min.	P <sub>v</sub> O <sub>2</sub> 36 mm Hg
S <sub>a</sub> O <sub>2</sub> 98 %	3.5 ml O <sub>2</sub> / 100 gr/min.	S <sub>v</sub> O <sub>2</sub> 64 %
P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> 40 mm Hg	10 mgr C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> / 100 gr/min.	P <sub>v</sub> CO <sub>2</sub> 49 mm Hg

Figura No. 1 Balance energético del cerebro. (Modificada de Plum, et al., 1982).

Es bien sabido que el cerebro depende por completo del proceso de glucólisis y respiración dentro de sus propias células para sintetizar sus substratos energéticos. Las enzimas que regulan la glucólisis están situadas en el citoplasma celular, en tanto que las que generan el más eficiente sistema productor de ATP o ciclo respiratorio del ácido cítrico se encuentran dentro de las mitocondrias (figura No. 2) (Navarro, 1991). Normalmente la glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) proporciona todo el substrato para la producción de energía por el cerebro y cada mol genera ATP a partir de ADP de acuerdo con la siguiente fórmula:



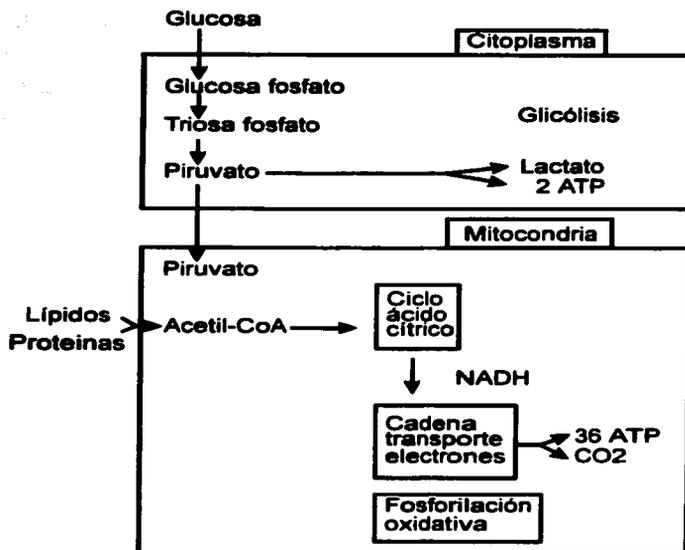


Figura No. 2 Glicólisis-fosforilación oxidativa. (Tomada de Navarro, 1991).

Como se puede observar, el proceso de la respiración que requiere oxígeno ( $O_2$ ) es mucho más eficaz que la glicólisis para generar los requerimientos energéticos del cerebro.

El  $O_2$ , la  $C_6H_{12}O_6$  y la circulación sanguínea operan interdependientemente para abastecer al cerebro con el sustrato y cofactores que requiere para llevar a cabo las reacciones químicas que generan su energía y sintetizan sus componentes estructurales (Plum et al., 1982; Dearden, 1985; Martínez, 1991; Ganon, 1996).

En condiciones normales el flujo sanguíneo cerebral (FSC) es autorregulado, de forma tal que el cerebro humano en reposo recibe aproximadamente 55 ml/100g/min (esto es aproximadamente 100ml/100g/min en ratas). Dicho flujo garantiza una cantidad continua y adecuada tanto de  $O_2$  como de  $C_6H_{12}O_6$  para que el cerebro pueda desarrollar sus funciones básicas especializadas (Astrup, Siejjo y Symon, 1981; Plum et al., 1982; Dearden, 1985; Martínez, 1991; Navarro, 1991; Buchan, 1992). -

En la isquemia, el cerebro o alguna de sus partes, es privado del abastecimiento sanguíneo (Graham, 1992). Dicho suministro sanguíneo puede disminuir gradualmente y ocasionar diferentes alteraciones. Por ejemplo si el FSC disminuye un 40% de lo normal, se presentará aumento en la concentración extracelular del ion hidrógeno ( $H^+$ ), mientras que si el FSC disminuye hasta 20ml/100g/min (más del 60% de lo normal) los potenciales provocados ya no pueden producirse y el electroencefalograma (EEG) se vuelve isoelectrico (Astrup et al., 1981; Dearden, 1985; Buchan, 1992). Sin embargo, el silencio eléctrico no es sinónimo de pérdida de viabilidad neuronal (Astrup et al., 1981; Dearden, 1985; Navarro, 1991). Cuando el FSC disminuye alrededor de 20ml/100g/min y se mantiene durante 30 minutos la migración de agua ( $H_2O$ ) del fluido extracelular hacia el medio intracelular determina que los astrocitos se hinchen y consecuentemente se presenta edema cerebral (Dearden, 1985; Martínez, 1991). Si en la red neuronal se aumenta el contenido cerebral de  $H_2O$  se establece el edema citotóxico, inicialmente distribuido en áreas isquémicas de la sustancia gris. Esto puede reducir el FSC por el aumento local de la presión tisular o por distorsión de los vasos sanguíneos e incremento de la resistencia al flujo. Cuando el FSC disminuye más del 80% de lo normal (10ml/100g/min) causa una despolarización súbita de la membrana de la neurona con un flujo saliente rápido de iones potasio ( $K^+$ ) al medio extracelular. Este flujo sanguíneo se considera como la posibilidad de flujo umbral para el infarto (Astrup et al., 1981; Heiss, 1983; Dearden, 1985). Si el FSC disminuye hasta 6-9ml/100g/min (más del 86% de lo normal) comienza el flujo entrante de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) lo que conlleva el inicio de procesos enzimáticos de daño celular irreversible (figura No. 3) (Dearden, 1985; Uematsu, Greenberg, Reivich y Karp, 1988; Gutiérrez, 1991; Navarro, 1991; Buchan, 1992). Las observaciones experimentales en animales establecen el nivel crítico de FSC alrededor de 15ml/100g/min en la sustancia gris (menos del 70% de lo normal), ya que a este nivel o por abajo de él, el potencial eléctrico falla, el  $K^+$  sale rápidamente de las células

y la necrosis celular se inicia de inmediato. Situaciones similares pueden aplicarse al hombre, ya que reducciones en la circulación cerebral por abajo de 20ml/100g/min, consistentemente producen lentitud ipsilateral del EEG en enfermos que sufren ligadura de la arteria carótida como preparación para una endarterectomía carotídea o el pinzamiento de un aneurisma (Astrup et al., 1981; Plum et al., 1982; Heiss, 1983). Sin embargo, se ha observado que el desarrollo de signos neurológicos en la mayoría de los enfermos con isquemia o hipoxia depende más de la intensidad y la duración del proceso que de su causa específica. Además la isquemia considerada como insuficiencia vascular, es más peligrosa que la hipoxia sola, porque los productos potencialmente tóxicos del metabolismo cerebral, como el ácido láctico, no son eliminados (Plum et al., 1982; Gutiérrez, 1991; Buchan, 1992).

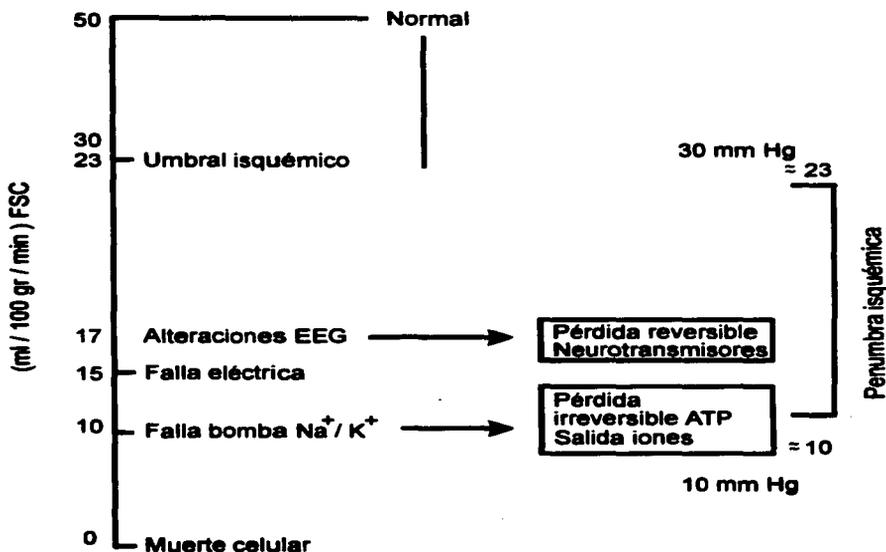


Figura No. 3 Flujo sanguíneo cerebral. (Tomada de Navarro, 1991).

Algunos de los efectos indirectos causados por el cese circulatorio son la falla del centro respiratorio, del centro vasomotor, acidosis láctica y otras alteraciones en la composición de la sangre. Otros efectos son más localizados, por ejemplo, la pérdida de la autorregulación y de otros mecanismos que participan en el control de la distribución del flujo, como son, la presión de perfusión cerebral (PPC) y la resistencia vascular cerebral (RVC), la reperfusión alterada debida a la estasis inducida por incremento en la viscosidad sanguínea, ruptura de la barrera hematoencefálica, el edema vasogénico y el incremento de la presión intracraneal (PIC) (Ames y Nesbett, 1983; Kaplan, Dimlich, Biros y Hedges, 1987; Krause et al., 1988; Graham, 1992).

### 1.1.2 Clasificación

La isquemia cerebral y los modelos animales de isquemia se dividen en dos tipos: global y focal. La **isquemia** que se presenta en el paro cardíaco es **global**. ésta a su vez puede ser **completa**, es decir hay cese completo de la circulación e implica anoxia, o **incompleta** la cual involucra el mantenimiento de algún FSC y por lo tanto hipoxia; el daño isquémico es típicamente distribuido a lo largo de zonas límites de flujo entre las arterias cerebrales principales (Raichle, 1983; Kaplan et al., 1987; Martínez, 1991; Buchan, 1992). Los modelos globales se inducen por oclusión transitoria de ambas arterias carótidas comunes con hipotensión general u oclusión bilateral previa de las arterias vertebrales, por paro cardíaco funcional o completo (i.e. arritmias ventriculares en las cuales el débito cae por abajo de los requerimientos de perfusión cerebral) y por hipertensión intracraneal severa (Plum et al., 1982; Buchan, 1992; Graham, 1992).

La **isquemia focal** invariablemente es **incompleta** y surge cuando el abastecimiento del flujo sanguíneo de una arteria es reducido o frenado por oclusiones vasculares cerebrales ya que generalmente se presenta FSC compensador de áreas circunvecinas en forma temprana y posteriormente se presenta la recirculación por recanalización de los vasos ocluidos (Raichle, 1983; Kaplan et al., 1987; Martínez, 1991; Buchan, 1992). Los modelos focales son por ejemplo el cardioembolismo, el émbolo arteria-arteria y otros muchos que ocasionan la oclusión de arterias

**cerebrales, como la arteria cerebral media (ACM) o de arterias cervicales (Brierley, Meldrum y Brown, 1973; Plum et al., 1982; Kaplan et al., 1987; Buchan, 1992).**

**Desde el punto de vista clínico la investigación de la isquemia cerebral focal es más importante que la de la isquemia global, ya que la isquemia focal es la contraparte del ataque isquémico cerebral en el humano, dado que ocurre más frecuentemente que la isquemia global (Plum et al., 1982; Nedergaard, 1988; Lutz, et al., 1994).**

**Una clasificación de los modelos experimentales de isquemia cerebral se muestra en la tabla No. I (Molinari y Laurent, 1976).**

**El cese temporal de la circulación afecta directamente a las células del sistema nervioso central (SNC) ya que se evita el cambio de substratos y productos del metabolismo. Dicha alteración de intercambio de metabolitos persiste por algún tiempo después de que la circulación se restaura y puede desempeñar un papel importante para limitar la recuperación (Drewes, Gilboe, Betz, 1973; Ames et al., 1983; Graham, 1992).**

### **1.1.3 Alteraciones secundarias a la isquemia cerebral**

**Diversos estudios realizados en torno a la idea de que el cerebro se daña fácilmente por periodos relativamente cortos de isquemia-hipoxia, han permitido cierta caracterización del daño ocasionado al cerebro por la isquemia y la reperfusión y se han descrito características metabólicas, electrofisiológicas, morfológicas y funcionales. Sin embargo todavía no se sabe exactamente si la reperfusión por sí misma es la que produce el daño o bien si acelera la lesión producida en las células durante la isquemia (Pulsinelli, 1985; Krause et al., 1988; Téllez, Carvajal, García, Vásquez, Chávez y Moreno, 1996).**

**Tabla No. I Clasificación de los modelos experimentales de isquemia por etiología y distribución del deterioro circulatorio (Molénari y Laurent, 1976).**

**Etiología de la isquemia**

Distribución de la isquemia	Extravasacular		Intravasacular	
	Global	Ligadura de arteria braquiocefálica. Compresión cervical*		Hipotensión* Paro cardiaco*
Hemisférica	Ligadura de arteria carotida interna* Anastomosis incompleta o parcial del círculo arterial cerebral.		Perfusión intracarotidea con cera o acetato de polivinil	
Multifocal			Embolo con microesferas o coágulo sanguíneo autólogo*	
Focal	Regional	Segmental	Regional	Segmental
	Única con pinza*	Múltiples pinzas* Electrocauterización* Vasoespasmos*	Embolo esférico Microesferas	Embolismo con catéter de Fogarty*

\* contraparte clínica en el hombre

1.1.3.1 Alteraciones metabólicas y electrofisiológicas. Las neuronas han desarrollado ciertos mecanismos para reducir o retardar la caída de ATP durante la anoxia. Dichos mecanismos incluyen: 1) los depósitos de fosfocreatina (PCR) y los fosfatos de alta energía que pueden contribuir

con energía para mantener los niveles de ATP, 2) producción de niveles bajos de ATP mediante la glucólisis anaeróbica y 3) bloqueo rápido de la actividad eléctrica espontánea (Kass, Abramowicz y Cottrell, 1989; Gutiérrez, 1991). Cuando los mecanismos que mantienen estas reservas energéticas funcionan mal, los niveles de ATP y la PCr disminuyen, las membranas pierden su mecanismo de bombeo, las células se hinchan y en cierto grado la neurona pierde su capacidad de recuperación (Plum et al., 1982; Krause et al., 1988; Lutz et al., 1994).

Las evidencias sugieren que la respuesta cerebral a la isquemia-anoxia puede dividirse en tres grandes fases (figura 4) (Lutz et al., 1994).

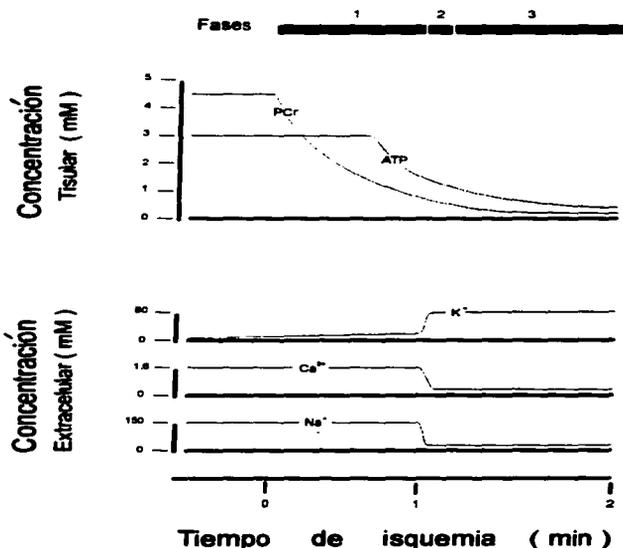


Figura No. 4 Cambios en ATP, PCr y concentración iónica extracelular durante la isquemia en el cerebro de la rata. (Tomada de Lutz et al., 1994).

**Fase 1. Depresión metabólica, un mecanismo de protección neuronal.** Pocos segundos después de iniciada la isquemia, el cerebro se depleta de los fosfatos de alta energía y agota sus reservas de carbohidratos a través del metabolismo anaeróbico. La PCr disminuye a un valor cercano a cero en el primer minuto, el ATP alcanza su valor mínimo a los dos minutos y la reserva total de energía está en sus valores más bajos a los 5 minutos.

La interrupción rápida en la transmisión sináptica que ocurre tempranamente durante la isquemia-hipoxia puede deberse a varias causas entre las que están: la falla del impulso presináptico para liberar neurotransmisor, cambios en la conductancia iónica, alteración en las propiedades del receptor y reducción en la excitabilidad posináptica. La supresión de la transmisión sináptica probablemente se deba a una combinación de varios efectos, entre los que se han sugerido la falla inicial en la liberación de neurotransmisor durante la isquemia-hipoxia debida al bloqueo de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) y con la recaptura normal de  $\text{Ca}^{2+}$  el bloqueo del neurotransmisor no se puede llevar a cabo. La inactivación de los CCSV puede ser causada por un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado de los depósitos intracelulares durante la hipoxia (Kass, et al., 1989; Navarro, 1991; Buchan, 1992; Lutz et al., 1994). Otro factor es el tiempo (varios minutos) de hiperpolarización que el tejido neuronal muestra durante la anoxia. La hiperpolarización puede causar depresión de la excitabilidad neuronal y a pesar de la entrada excitatoria no se alcanza el umbral para generar el potencial de acción. En las neuronas piramidales del hipocampo la hiperpolarización anóxica se acompaña por falla del 50% en la resistencia de la membrana, lo que puede ser suficiente para que por si misma explique la fuerte depresión de excitabilidad en este tejido. La combinación de hiperpolarización y falla en la resistencia de la membrana se debe a la activación de los canales de  $\text{K}^{+}$  que producen un potencial de membrana desviado hacia el potencial de equilibrio del  $\text{K}^{+}$ . Al mismo tiempo las corrientes entrantes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de sodio ( $\text{Na}^{+}$ ) se deprimen. La disminución de la actividad neuronal provee un considerable ahorro energético, por lo tanto el estado de hiperpolarización puede ser visto como una respuesta protectora que permite al cerebro persistir y mantener gradientes iónicos y potenciales de membrana durante la fase de depresión del suplemento energético, aunque sólo por unos minutos. El incremento en la permeabilidad del  $\text{K}^{+}$  produce fuga neuronal de este ion y un aumento lento del

mismo en los niveles extracelulares. Conforme el  $K^+$  extracelular aumenta, el potencial de membrana se desestabiliza y llega al umbral; además la impedancia tisular (reducción del espacio extracelular) disminuye cerca del 20%, seguido por edema de astrocitos.

Entre los mecanismos responsables del incremento en la conductancia del  $K^+$  están por lo menos dos tipos de canales de  $K^+$ , uno activado por el incremento intracelular de  $Ca^{2+}$  y el otro activado por la disminución del ATP (canal  $K^+_{ATP}$ ). La activación de los canales de  $K^+$  sensibles a  $Ca^{2+}$  es responsable de la supresión temprana del EEG que ocurre en los primeros 15 segundos de isquemia; el aumento inicial del  $Ca^{2+}$  citosólico se debe a la liberación de los depósitos intracelulares que hacen que el  $Ca^{2+}$  extracelular disminuya durante este período (Silver y Erecinska, 1990). Los canales de  $K^+_{ATP}$  pueden por lo menos mediar la hiperpolarización en ciertas regiones cerebrales, tales como el hipocampo y el tallo cerebral, aunque existe cierta controversia que hace pensar que a pesar de que la transmisión sináptica esté abolida, sólo se vean en el cerebro cambios marginales en las concentraciones de ATP. Sin embargo los canales de  $K^+_{ATP}$  pueden ser activados por incrementos en los niveles de ADP, que aumentan dos y cuatro veces en la corteza de la rata después de 15 segundos y 45 segundos de isquemia respectivamente. Además, es evidente que la reducción más sustancial de ATP ocurre en áreas tales como el hipocampo donde las sinápsis excitatorias están concentradas (lámina molecular) (Lipton y Wittingham, 1982). En el hipocampo por lo menos, los canales de  $K^+_{ATP}$  son los que participan en la liberación del glutamato de la terminal axónica y pueden servir para reducir la liberación de este neurotransmisor excitador en la etapa inicial de la anoxia (Raichle, 1983; Krmjevic, 1990; Martínez, 1991; Lutz et al., 1994).

**Fase 2. Falla energética completa y despolarización anóxica.** En esta fase suceden dos mecanismos importantes:

*i) Movimiento iónico.* Como se mencionó anteriormente, durante la fase 1 el  $K^+$  es el único ion que muestra cambios notables en el espacio extracelular, mostrándose un flujo saliente relativamente lento y constante. Sin embargo, cuando la concentración extracelular de  $K^+$  llega alrededor de 10mM, se presenta un cambio brusco y el  $K^+$  extracelular aumenta excesivamente hasta 50-70mM

en pocos segundos mientras que el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan dentro de las neuronas y la impedancia tisular aumenta en un 50%. El incremento rápido del  $\text{K}^+$  extracelular corresponde a la despolarización neuronal siempre que ésta sea anóxica. Aparte del incremento drástico del  $\text{K}^+$  extracelular hay aumentos simultáneos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de las neuronas y probablemente estos iones son más importantes que el movimiento del  $\text{K}^+$  para el desarrollo de la muerte celular por anoxia (Raichle, 1983; Uematsu et al., 1988; Krause et al., 1988; Kass et al., 1989; Gutiérrez, 1991; Lutz et al., 1994).

La naturaleza exacta del mecanismo responsable del incremento súbito de la permeabilidad de la membrana al  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  durante esta segunda fase no es bien entendida. Varios mecanismos se han sugerido. Una de las explicaciones más aceptadas es que la membrana despolarizada induce la apertura de los canales de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje y los mismos canales son los responsables de la generación y terminación del potencial de acción y del inicio de la liberación del neurotransmisor. Sin embargo, experimentos en donde uno o más de estos canales han sido bloqueados, indican que la apertura de los canales iónicos sensibles a voltaje no es el único mecanismo por el cual la membrana neuronal se abre a los iones durante la fase 2. Otras posibles vías de entrada para estos iones son a través de canales iónicos ligando dependientes, por ejemplo los cationes no selectivos a glutamato tales como el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Datos recientes sugieren que el receptor NMDA puede abrir su canal en respuesta a la falla energética celular por la pérdida de uno o más mecanismos intracelulares que regulan el estado del canal. Esto es, la apertura del canal puede ocurrir en ausencia de cualquier aumento neto de los niveles endógenos de los ligandos del receptor NMDA como son el glutamato (Glu) o el aspartato (Asp) (Buchan, 1992; Lutz et al., 1994).

Otro posible mecanismo que determina la despolarización anóxica incluye un intercambiador iónico  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  el cual facilitaría el movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula como resultado de la inversión del gradiente normal de  $\text{Na}^+$  (Lutz et al., 1994; Álvarez, Merediz y Fernández, 1994).

*ii) Liberación del neurotransmisor.* Nemoto (1979) sugirió el papel de la disfunción de neurotransmisores (NTS) en la patogénesis del daño isquémico cerebral. Esto fue reforzado por los hallazgos de Williams y Grossman (1969) y por Carregal (1975) quienes plantearon la susceptibilidad de la transmisión sináptica en la isquemia-anoxia (Cotman, Foster y Lanthorn 1981; Meldrum, 1981; Jorgensen y Diemer, 1982). Con base en dichos hallazgos, se sabe que otro evento drástico que sucede durante la isquemia-anoxia es la liberación masiva de NTS para que interactuen con sus receptores y por lo tanto activen canales iónicos asociados al receptor. Muchos de los estudios se han enfocado a los aminoácidos y principalmente al Glu, Asp, ácido gama amino butírico (GABA), glicina, taurina y ácido homocisteínico y se ha demostrado que su liberación durante la isquemia-anoxia ocurre en varias áreas del cerebro de mamíferos como son la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo y el cuerpo estriado. Al parecer la liberación rápida de estos aminoácidos durante la fase 2 de la isquemia-ánoxia es un fenómeno general.

Se pueden mencionar dos mecanismos principales durante la isquemia-anoxia que determinan el movimiento del neurotransmisor (NT) del compartimiento intracelular al extracelular. El primero es la vía que normalmente se sigue en la liberación del NT en respuesta a la despolarización de la membrana, esto es la unión de las vesículas que contienen el NT con la membrana presináptica que se inicia por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los CCSV, este mecanismo es inhibido por la caída en la energía celular porque la unión de las vesículas a la membrana presináptica requiere de ATP. La segunda vía que se ha sugerido al menos para el Glu es la pérdida de Glu de los depósitos metabólicos (extravesiculares). La falla en el cotransportador responsable de la recaptura del Glu a partir del espacio extracelular puede estar involucrado en este aspecto. Este cotransportador normalmente se activa por gradientes de  $Na^+$  y por el potencial de membrana y transporta una molécula de Glu por dos de iones de  $Na^+$  hacia el interior de la célula. Cuando el gradiente de  $Na^+$  se pierde después de la despolarización el cotransportador  $Na^+/Glu$  no es capaz de movilizar el Glu del espacio extracelular. La detención de la recaptura del Glu determinará un aumento de los niveles extracelulares de Glu y por lo tanto la concentración intracelular de Glu empezará a ser 1000 veces más alta que la concentración extracelular. La pérdida del gradiente de  $Na^+$  puede causar que el cotransportador  $Na^+/Glu$  invierta su acción y directamente cause liberación de Glu de la poza

citoplasmática al espacio extracelular (Taylor, Geer y Buke, 1992; Lutz et al., 1994). Un mecanismo similar puede plantearse para otro aminoácido tal como el GABA porque durante la anoxia también es tomado por un mecanismo que involucra un cotransportador de  $\text{Na}^+$ .

Debido a que la liberación de NT es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, mientras que el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{Glu}$  no lo es, experimentalmente es posible separar la contribución de dichos mecanismos, ya que la liberación de Glu que ocurre antes de la despolarización no es dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y se ha sugerido que viene de la tasa metabólica (Ikeda, Nakazawa, Abe, Kaneko y Yamatsu 1989; Lutz et al., 1994) aunque alternativamente esta liberación de Glu puede ser estimulada por un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a partir de sus depósitos internos (Katchman y Hershkowitz, 1993). La liberación de Glu ( $\text{Ca}^{2+}$  y ATP dependiente) parece tener una contribución importante durante la etapa inicial de la isquemia-anoxia, porque es inhibida por la caída de la carga energética (Krause et al., 1988; Kass et al., 1989; Lutz et al., 1994) .

**Fase 3. Destrucción neuronal.** Durante esta fase ocurren varios fenómenos:

*i) Los neurotransmisores como excitotoxinas.* El aumento significativo en los niveles extracelulares de NTS excitatorios tales como el Glu, Asp y dopamina puede ser la causa principal de la destrucción neuronal después de la isquemia-anoxia, puesto que se sabe que estos NTS se comportan como excitotoxinas cuando sus concentraciones extracelulares son altas.

Se sabe que en condiciones normales el Glu se encuentra retenido en compartimientos intracelulares y bajo ciertas condiciones como isquemia, hipoxia o hipoglicemia, se produce despolarización neuronal y subsecuentemente liberación de Glu en terminales excitatorias. El Glu es inactivado por los astrocitos y la terminal axónica lo recaptura y subsecuentemente lo convierte en glutamina (Hertz 1981; Jorgensen et al., 1982). Esta inactivación puede ser susceptible de alteración por la isquemia (Diemer 1980) ya que: (1) los astrocitos y la terminal presináptica se edematizan en la primera hora de recirculación, lo que posiblemente indica falla en el sistema de transporte membranal (Von Lubitz y Diemer 1982; Jorgensen et al., 1982) y (2) la conversión de glutamato a glutamina es dependiente

**de ATP el cual es depletado durante la isquemia (Ljunggren, Schutz y Siesjö, 1974; Jorgensen et al., 1982).**

**Un aspecto que ha sido difícil de resolver por cuestiones técnicas ha sido el curso temporal de la liberación del NT durante la isquemia-anoxia. Esto es: ¿la liberación del NT es una consecuencia de la despolarización anóxica? o ¿la despolarización anóxica es causada por la liberación del NT?. Estas interrogantes no se han podido resolver dadas las limitaciones técnicas relacionadas con la sensibilidad del microelectrodo usado en la microdiálisis. Sin embargo estudios *in vivo* de microdiálisis muestran un marcado incremento en los niveles extracelulares de Glu (8 a 9 veces) y de Asp después de 5 a 20 minutos de iniciada la isquemia global completa y con una variable de más tiempo en relación con la isquemia focal (Nedergaard, 1988; Krause et al., 1988; Park, McCulloch, Kang y Choi, 1992; Meldrum, 1995). Aunque bajo ciertas condiciones la liberación de Glu dependiente de  $Ca^{2+}$  contribuye a los cambios extracelulares, la liberación parece estar asociada con la despolarización anóxica de las neuronas y las dendritas (Meldrum, 1995).**

**Los mecanismos de neurotoxicidad del Glu no están bien definidos pero parecen ser a través de dos componentes: 1) ocasiona aumento de la conductancia membranal para el  $Na^+$ , lo que causa la entrada de  $Na^+$  y consecuentemente de cloruro ( $Cl^-$ ) y agua ( $H_2O$ ) y 2) produce la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana neuronal con el consecuente incremento del  $Ca^{2+}$  citosólico a niveles tóxicos, es decir el efecto del Glu es de dos tipos: osmótico y relacionado con el  $Ca^{2+}$  (Martínez, 1991; Meldrum, 1995). El  $Ca^{2+}$  entra también en terminaciones presinápticas liberando más Glu de forma tal que se produce retroalimentación positiva; esta propagación puede ser la explicación de la lentificación en el desarrollo de la lesión isquémica neuronal en el hipocampo tanto en humanos como en modelos experimentales.**

**Parece ser que la toxicidad del Glu durante la isquemia-anoxia está fuertemente relacionada con la habilidad que tiene para estimular la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula. En neuronas hipocampales de rata en cultivo expuestas a altas concentraciones de Glu durante 30 min, se ha observado lesión severa si el  $Ca^{2+}$  está presente en el medio de cultivo. Sin embargo debe mencionarse que la exposición al**

**Glu en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  produce edema celular. Es probable que debido a una alteración en el mecanismo de recaptura del Glu, Asp y dopamina estos se mantengan en altas concentraciones e inclusive se mantengan en niveles altos después de varias horas de que la circulación se halla restablecido después de la isquemia (Lutz et al., 1994).**

**Evidencias sustanciales sugieren que la transmisión excitatoria es neurotóxica durante la isquemia-anoxia. Por ejemplo si se suspende la entrada excitatoria se observa que la lesión isquémica disminuye importantemente en dendritas altamente susceptibles como las del área CA1 del hipocampo. Estudios *in vitro* muestran que el aumento en los niveles de Glu y Asp matan a las neuronas aun sin otra lesión y que la muerte neuronal anóxica se previene con un bloqueador de aminoácidos excitatorios (Kaplan et al., 1987).**

**El Glu juega un papel importante en la producción del daño neuronal a través de su acción como agonista de los receptores AMPA (amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionato) y NMDA y se ha sugerido que la activación de los receptores AMPA por el Glu durante la isquemia-anoxia modula el estado de activación de los receptores NMDA. Cuando el Glu activa al receptor AMPA, el canal iónico con conductancia para los cationes monovalentes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se abre y determina que se despolarice la neurona. Esta despolarización a su vez permite la activación del receptor NMDA quitando la dependencia de voltaje de este receptor. Esto es, una despolarización inicial de la membrana neuronal causada por una activación del AMPA (u otros canales con conductancia al  $\text{Na}^+$ ) conlleva a que el Glu active al receptor NMDA el cual, además de permitir la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  tiene alta conductancia para el  $\text{Ca}^{2+}$  lo que causa que el  $\text{Ca}^{2+}$  entre a la célula con devastadoras consecuencias (Park et al., 1992; Lutz et al., 1994; Tsubokawa, Oguro, Robinson, Masuzawa y Kawai, 1995; Meldrum, 1995).**

***ii) Calcio intracelular.* El aumento brusco del  $\text{K}^+$  extracelular está asociado con una rápida caída de las concentraciones extracelulares del  $\text{Ca}^{2+}$ . Este aumento no controlado de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular parece ser un factor determinante del daño neuronal, ya que afecta el citoesqueleto por degradación**

de los neurofilamentos y daño de los microtúbulos; altera la funcionalidad de la membrana neuronal con la consecuente muerte celular (Nedergaard, 1988; Lutz et al., 1994; Ghosh y Greenberg, 1995).

Dentro del aspecto fisiológico de la neurona los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son base de varias funciones. El  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser un segundo mensajero y regular significativamente varias vías metabólicas. La concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es alrededor de  $10^{-7}\text{M}$ , lo que corresponde a 1/10,000 de la concentración extracelular. Como se mencionó anteriormente el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula incluye la apertura de CCSV, la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de agonistas (CCDA) tales como el receptor NMDA (rNMDA) e inversión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que es el mecanismo principal de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Raichle, 1983; Kaplan et al., 1987; Álvarez et al., 1994; Lutz et al., 1994; Ghosh et al., 1995).

Dentro de los CCSV hay varios tipos entre los que están: el L, N y P. Se sabe que los canales tipo N y P están implicados en el control de la liberación de NT, mientras que el canal tipo L está involucrado en la modulación de la liberación de ciertos NTS y en la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de señales de eventos neuronales postsinápticos. Por ejemplo en las neuronas piramidales del hipocampo hay una concentración de canales tipo L en la base de las dendritas apicales (Ghosh et al., 1995). A nivel de la terminal presináptica el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular facilita la liberación de aminoácidos excitadores (Glu y Asp) de la terminal presináptica. En la membrana posináptica despolarizada la liberación de Glu activa al rNMDA con el consecuente aumento en la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  (Lutz et al., 1994).

La activación del receptor metabotrópico de glutamato ( $\text{RmGlu}$ ) en las células piramidales del hipocampo causa una corriente saliente lenta de  $\text{K}^+$  mediante la activación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rosdahl, Seitzberg, Christensen, Balchen y Diemer, 1994; Meldrum, 1995).

Aunque la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra al citosol es a través de los canales de la membrana plasmática, la caída de ATP causa liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos internos, lo que contribuye significativamente a las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Ghosh et al., 1995).

Basicamente se puede hablar de los depósitos internos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico (RE) y en la mitocondria, sólo que ambos organelos requieren ATP y por lo tanto  $\text{O}_2$  para capturar al  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli, 1987; Lutz et al., 1994). La resultante del aumento en la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como disparo para varios eventos no fisiológicos, por ejemplo hidrólisis de fosfolípidos con la consecuente formación de radicales libres, además la mitocondria es significativamente sensible al proceso isquémico y al lesionarse no permite a la célula la producción de ATP y la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hillered y Chan, 1988; Beal, Hyman y Koroshetz, 1993; Lutz et al., 1994). Este mecanismo puede explicar la aparición del daño neuronal con cierta latencia después de un período de isquemia-anoxia. La liberación interna de  $\text{Ca}^{2+}$  también está mediada por distintos mecanismos. Uno de ellos es mediante la unión del inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) a los receptores de la membrana del RE, y otro es regulado por la activación del receptor ryanodina (RRyan) (Ghosh et al., 1995). Como podemos darnos cuenta, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula tiene varios efectos sobre los procesos intracelulares, lo que depende de la magnitud del influjo. Si la entrada no es masiva, se inducen diversos cambios intracelulares que incluyen desde alteraciones en la funcionalidad de la membrana celular, del citoesqueleto y de organelos celulares hasta la activación de segmentos del genoma celular. Sin embargo, si la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es masiva se activan lipasas y proteasas, así como el flujo entrante de otros iones como el  $\text{Cl}^-$  que ocasiona daño osmótico y ocurre lesión y daño de organelos celulares que son la causa de la muerte celular particularmente en el hipocampo (Bravo, 1991; Ghosh et al., 1995) ya que parece ser que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mantiene un daño permanente en la actividad neuronal aún después de que el cerebro ha sido reperfundido (Nedergaard, 1988; Uematsu et al., 1988; Martínez, 1991; Gutiérrez, 1991, Lutz et al., 1994).

*iii) Lipólisis.* En condiciones normales los fosfolípidos de membrana continuamente son degradados a ácidos grasos libres (AGL) (Nedergaard, 1988; Murray, Granner, Mayes y Rodwell, 1992; Ganon, 1996). La depleción de los depósitos energéticos que sucede durante la isquemia inhibe la síntesis de ATP y el flujo entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  que se establece acelera dicha degradación de fosfolípidos (Rolfen y Davis, 1989). El  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser que juega un papel importante desde el momento que es activador de fosfolipasas principalmente fosfolipasa C y  $\text{A}_2$ , esta última cataliza el proceso de desintegración de fosfolípidos a AGL. La pérdida de ATP también es importante por sí misma ya

que integra fosfolípidos a partir de AGL, proceso que requiere de ATP y que por supuesto se detiene durante la falla energética, de aquí que la pérdida de ATP ocasiona que el metabolismo de lípidos se acentúe a catabolismo de fosfolípidos (Hansen y Lundbaek, 1989; Rolfsen et al., 1989; Lutz, et al., 1994). Los productos de la hidrólisis de fosfolípidos durante la isquemia-anoxia son los AGL (principalmente ácido araquidónico) diacilglicerol (DG), lisofosfolípidos e  $IP_3$ . Esta hidrólisis de los fosfolípidos tiene varias influencias en el funcionamiento celular, por ejemplo actúa sobre la membrana celular modificando la permeabilidad a varios iones. El  $IP_3$  es un mensajero intracelular que causa liberación de  $Ca^{2+}$  del medio intracelular, agregándose ya de por sí a un mecanismo no controlado que aumenta el  $Ca^{2+}$  intracelular. Los AGL y los lisofosfolípidos pueden actuar como detergentes sobre la membrana celular. El ácido araquidónico así como otros lípidos que se forman durante la isquemia-anoxia y reperfusión son potentes inhibidores de la bomba de  $Na^+/K^+$  y por lo tanto pueden actuar modificando significativamente la permeabilidad membranal (Lees, 1991; Lutz et al., 1994). Algunos de los metabolitos de la hidrólisis de fosfolípidos son transformados en factor activador de plaquetas (FAP), prostaglandinas, leucotrienos y tromboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ), todas estas sustancias pueden alterar el metabolismo celular cuando se encuentran en cantidades excesivas (Rolfsen et al., 1989; Siesjö y Katsura, 1992; Lutz et al., 1994; ). Por ejemplo el FAP tiene poderosa acción proagregadora y agente hemostático que puede iniciar la reacción inflamatoria en los vasos sanguíneos. La prostaglandina  $F_2$  es un potente inhibidor de la bomba  $Na^+/K^+$  (Lees, 1991; Lutz et al., 1994). Los leucotrienos contraen el músculo liso e incrementan la permeabilidad vascular. El metabolismo del ácido araquidónico cesa en la isquemia completa, mientras que la progresión del ácido araquidónico a  $TxA_2$  se acelera durante la isquemia incompleta. Esta es una de las razones por las que la isquemia incompleta es más nociva que la isquemia completa (Kaplan, et al., 1987; Nedergaard, 1988; Tanaka, Fukuuchi, Gomi, Takashima, Mihara, Shirai, Nogawa, Nozaki y Nagata, 1993; Lutz et al., 1994). La acumulación de AGL puede producir desacoplamiento de la fosforilación oxidativa e interferir con el sistema de transporte de electrones en las mitocondrias (Plum, 1983; Meldrum, 1990; Ginsberg, 1990; Martínez, 1991).

Si el tejido se reperfunde con  $O_2$  los lípidos que se han acumulado durante la isquemia-anoxia pueden ser oxidados y esto determina la formación de aldehídos altamente citotóxicos y la formación

de radicales libres (Rehncrona, Westerberg, Akesson y Siesjö, 1982; Martínez, 1991; Gutiérrez, 1991; Lutz et al., 1994).

*iv) Edema celular.* Otro proceso importante que causa la muerte celular es el edema celular. Normalmente el espacio intersticial en el cerebro es alrededor del 20% del volumen cerebral. El edema celular se inicia durante la fase 1 y existe por lo tanto una drástica y súbita caída del 6% del volumen cerebral durante la despolarización anóxica. El edema celular durante la isquemia anoxia parece ser la causa de que se presente una entrada de H<sub>2</sub>O acompañada de los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Una de las razones del porque la reducción parcial del FSC puede causar más daño que la reducción total, es que la detención completa de la circulación cerebral limitará el edema celular debido a que no se transporta H<sub>2</sub>O hacia el cerebro para continuar con el proceso de edema (Hossman y Kleihues, 1973; Raichle, 1983; Nedergaard, 1988; Cohan, Mun, Petite, Correira, Da Silva y Waldhorn, 1989; Lutz et al., 1994).

Klatzo en 1967 describió los diferentes tipos de edema cerebral que ocurren durante el fenómeno isquémico. En el inicio (1-2 días) se desarrolla **Edema Cerebral Citotóxico** que se caracteriza por aumento del contenido de H<sub>2</sub>O en el espacio intracelular con la consecuente tumefacción de las neuronas. Posteriormente aparece el **Edema Cerebral Vasogénico** (después del 3er. día) el cual se caracteriza por la salida de líquido de los vasos intracerebrales que condiciona aumento patológico en el contenido acuoso del tejido encefálico, debido al incremento de H<sub>2</sub>O en el compartimiento extracelular al parecer condicionado por el efecto de los productos tóxicos provenientes de la destrucción celular (sistema de Kinina-Kalikreina, Acido Glutámico y Acido Araquidónico) (Klatzo, 1967; Fishman, 1975; Martínez, 1991)

*v) Formación de radicales libres.* Un radical libre es una molécula que tiene como característica que en su órbita tiene un electrón único en lugar de un par de electrones que se requieren para ser estable. Por lo tanto los radicales libres son altamente reactivos debido a su tendencia a agregarse a otras moléculas con las cuales entran en contacto. Los radicales libres más importante desde el punto de vista biológico son el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxihidroxil (HO<sub>2</sub>) y el radical hidroxil (HO).

Además está el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que frecuentemente se incluye dentro de estas moléculas reactivas. Se ha pensado que mucho del daño celular que ocurre después de establecer el  $O_2$  durante la isquemia-anoxia ha sido atribuido a la acción de los radicales libres (Flamm, Demopoulos, Seligman, Poser y Ransohoff, 1978; Siesjö, 1978; Lutz et al., 1994). La microvasculatura parece ser el órgano blanco de estos radicales libres y al dañarla modifican significativamente la barrera hematoencefálica (Siesjö y Katsura, 1992; Lutz et al., 1994).

Los daños que causan los radicales libres incluyen la desnaturalización de proteínas produciendo la inactivación de enzimas (Oliver, Starke-Reed, Stadtman, et al., 1990; Folbergrova, Kiyota, Pahlmark et al., 1993; Lutz et al., 1994), la ruptura de ADN y la iniciación de peroxidación lipídica, proceso que probablemente acelera la formación de radicales libres de manera muy significativa. Además causan destrucción directa de la integridad de la membrana y de las proteínas de membrana. La peroxidación lipídica determina la formación de productos tóxicos (Schmidley, 1990; Lutz et al., 1994). Los radicales libres también se pueden generar a partir de lípidos, por ejemplo a partir del ácido araquidónico cuando es metabolizado por la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa durante la reperfusión. Sin embargo la fuente más importante de radicales libres es el metabolismo de la purina, xantina e hipoxantina por la xantina oxidasa (XO). Durante la isquemia-anoxia se producen grandes cantidades de xantina e hipoxantina. La XO se forma bajo condiciones normales aeróbicas predominantemente en la forma conocida como xantina deshidrogenasa (XDH) la cual usa nicotinamida adenin-dinucleótido ( $NAD^+$ ) como donador de electrones, catalizando la siguiente reacción:



Durante la isquemia-anoxia suceden dos aspectos importantes. No sólo la degradación de ATP determina una acumulación de xantinas e hipoxantinas, los substratos que sirven para formar el superóxido, sino que también determina el cambio de XDH a XO que es un productor importante de uratos. Se piensa que ésto se lleva a cabo por el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular activando la enzima calpaina que promueve la conversión de XDH a XO. La XO usa  $O_2$  como donador de electrones y produce  $O_2^-$  por medio de la siguiente reacción:



Otro posible mecanismo para la producción de radicales libres durante la reperfusión incluye la disfunción o sobreactivación de la cadena respiratoria que determina la reducción de  $\text{O}_2$ , los neutrófilos responden al tejido lesionado por la formación excesiva de  $\text{O}_2^-$  o por la autooxidación de catecolaminas.

Dado que los radicales libres se producen durante el metabolismo normal, la célula posee mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos muy específicos cuya función es inactivar a los radicales libres tan rápido como aparezcan. Estos mecanismos incluyen por ejemplo a la enzima super-óxido-dismutasa (SOD) que transforma  $\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la catalasa y la peroxida de glutation que convierten  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  o  $\text{H}_2\text{O}$ . Estos sistemas enzimáticos están relacionados con mecanismos moleculares que involucran el ascorbato, vitamina E y glutation (Raichle, 1983; Kaplan et al., 1987; Krause et al., 1988; Nedergaard, 1988; Opie y Dphil, 1989, Lutz et al., 1994; Téllez et al., 1996).

*vi) Acidosis.* Está firmemente establecido que aquellas condiciones que promueven el metabolismo anaeróbico de la  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  para producir lactato incrementan el daño neuronal. Durante la isquemia ocurren cambios ácido-básicos caracterizados por un aumento en el contenido tisular de lactato desde los primeros 5 segundos de iniciada la isquemia y sigue en ascenso lineal en los 60 segundos subsecuentes, se considera que se alcanza una cantidad total de ácido láctico de  $9 \mu\text{mol}/\text{gr}$ . En la actualidad no se conoce qué mecanismos moleculares contribuyen a la disfunción de la membrana como resultado de la mayor acidosis durante la isquemia. Al parecer la acidosis aumenta las reacciones de los radicales libres (Ljunggren et al., 1974; Martínez, 1991; Lutz et al., 1994).

La diferencia entre la isquemia completa y la incompleta en el adulto es muy significativa debido a que esta última se asocia con acidosis láctica severa a nivel tisular. La acidosis es importante debido a que el flujo sanguíneo residual de la isquemia incompleta continua liberando  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  en un territorio con mecanismo glucolítico anaeróbico produciendo gran cantidad de ácido láctico (Raichle, 1983; Martínez, 1991; Lutz et al., 1994). La lactoacidosis tisular parece tener

determinación importante en la muerte de la célula isquémica y los niveles de  $C_6H_{12}O_6$  en el tejido preisquémico son los que determinan los niveles de lactoacidosis tisular (Pulsinelli, Levy y Duffy, 1982a; Raichle, 1983; Lutz et al., 1994). Estudios realizados en animales con isquemia cerebral total por periodos tan largos como una hora, mostraron al menos recuperación parcial del metabolismo tisular y de las funciones básicas, mientras que los animales sometidos a isquemia incompleta con menos del 10% del flujo sanguíneo normal no tuvieron dicha recuperación (Raichle, 1983; Kaplan et al., 1987; Nedergaard, 1988).

Durante la isquemia incompleta la acidosis láctica depende de dos factores: la glicemia y la cantidad de  $C_6H_{12}O_6$  suplementada por el FSC residual. Ante hiperglicemia el lactato tisular puede llegar hasta 20  $\mu\text{mol/gr}$  lo que condicionará un pH intracelular de 5.5 o menor (Raichle, 1983; Martínez, 1991).

La recuperación electrofisiológica puede empeorarse en relación directa con los niveles de lactato. La acidosis láctica produce disminución del pH y causa daño mitocondrial. También la concentración intracelular elevada de  $H^+$  puede dañar la mitocondria y ocasionar secuestro de  $Ca^{2+}$  por interferencia con el gradiente quimiosmótico (Kaplan et al., 1987; Lutz et al., 1994).

El paso final de la glucólisis anaeróbica -la reacción lactato deshidrogenasa- es responsable de la regeneración del  $NAD^+$ . Por lo tanto, si la glucólisis terminara en piruvato durante la anaerobiosis, el  $NAD^+$  se depletara y la glucólisis se detendría (Murray, Granner, Mayes y Rodwell, 1992; Lutz et al., 1994). Desafortunadamente, el resultado será la acumulación de lactato como producto metabólico final, con la consecuente acidosis intracelular (Carafoli, 1987). El aumento de la acidosis intracelular determinará daños significativos en el tejido neuronal (Rehncrona, Rosen y Siesjö, 1980; DeCourten-Meyers, Myers y Schoolfield, 1988). Durante la isquemia sostenida se han observado cambios significativos como edema, inhibición de la respiración mitocondrial, inhibición de la oxidación de lactato y la inhibición de la liberación de  $H^+$  produciendo la formación de radicales libres (Drewes et al., 1973; Marshall, Welsh, Durity, Lounsbury, Graham, Path y Langfitt, 1975a; Raichle, 1983; Krause et al., 1988; Kass, et al., 1989; Siesjö y Katsura, 1992; Lutz et al., 1994).

**1.1.3.2 Alteraciones morfológicas y funcionales.** Existen evidencias experimentales que sugieren fuertemente que el desarrollo del daño morfológico por isquemia cerebral es dependiente del tiempo. Se ha observado que el flujo umbral relacionado con la falla de la membrana celular es muy cercano al flujo umbral para que se desarrolle el infarto, sólo que para que se establezca el infarto se requiere de tiempo (Heiss, 1983; Graham, 1992).

Los neuropatólogos han definido por lo menos cuatro variedades morfológicas del daño cerebral isquémico, que incluyen: la autólisis, el infarto, la necrosis isquémica neuronal selectiva (NINS) y la necrosis neuronal generalizada (NNG). El **daño cerebral autolítico** se caracteriza por agrupamiento de cromatina, edema mitocondrial y dispersión uniforme de ribosomas a lo largo de todas las células cerebrales (Kalimo, García, Kamijyo, Tanaka y Trump, 1977; Pulsinelli, 1985). Tales cambios son la consecuencia de la isquemia terminal del cerebro sin reperusión como se ve en el tejido cerebral post-mortem. El **infarto cerebral** se define como una área de pannecrosis, esto es, el volumen de tejido en el cual todas las células (neuronas y glia), los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) y las fibras nerviosas (mielinizadas y no mielinizadas) sufren de necrosis (Marcoux et al., 1982; Pulsinelli, 1985; Torvik y Svindland, 1986; Nedergaard, 1988; Graham, 1992). La NINS se define como la zona de transición entre el área cerebral infartada y el tejido cerebral completamente normal, es decir se trata de la zona en la que se presenta pérdida irreversible de algunas neuronas y no así de otras células que preservan la estructura tisular (Pulsinelli, 1985; Nedergaard, 1988; Buchan, 1992; Graham, 1992). La NINS es particular para ciertas poblaciones de neuronas tales como las células piramidales de la región CA1 del hipocampo, las neuronas corticales de las láminas 3, 5 y 6, las células de Purkinje del cerebelo y las neuronas de tamaño pequeño y mediano del estriado (Pulsinelli, Brierley y Plum, 1982b; Buchan 1992).

La NNG se refiere a la destrucción celular severa en la que se presenta necrosis laminar densa con afección tanto de neuronas como de glia y endotelio (Pulsinelli, 1985; Nedergaard, Astrup y Klinken, 1984; Martínez, 1991).

Aunque las limitaciones de tiempo y espacio no permiten comparar detalladamente los factores involucrados en la producción de los diferentes tipos de daño cerebral isquémico, debemos tener presente las diferencias entre el infarto cerebral, la NINS y la NNG y considerar la posibilidad de que aunque todas las variedades de daño cerebral isquémico pueden compartir la vía final común de muerte celular, se disparan diferentes mecanismos que pueden diferir para cada una de estas entidades (DeGirolami, Crowel y Marcoux, 1984; Pulsinelli, 1985).

Uno de los principales mecanismos involucrado en el infarto es la influencia del flujo sanguíneo. La reducción de FSC no es homogénea en el tejido que sufre de isquemia incompleta. Frecuentemente en la isquemia focal se ha observado que el tejido forma un anillo alrededor del sitio en donde el daño isquémico es más severo y en el cual existen fallas energéticas y de los mecanismos de intercambio iónico. A esta condición de distribución geométrica se le conoce como "penumbra isquémica" (Astrup et al., 1981; Marcoux, Morawetz, Crowell, DeGirolami y Halsey, 1982; Torvik et al., 1986) y se refiere al tejido cerebral isquémico perfundido que está entre dos niveles, considerando como el nivel superior el flujo umbral para la falla de la función neuronal y el nivel inferior el flujo umbral para la falla de la membrana celular (Heiss, 1983). Es decir, el área alrededor del infarto conserva flujo sanguíneo residual suficiente para mantener la viabilidad del tejido pero insuficiente para permitir la transmisión sináptica normal, ya que el patrón en la reducción del flujo sanguíneo depende de los vasos colaterales y de la presión de perfusión local (Nedergaard et al., 1984; Torvik et al., 1986). Esto ha sido confirmado por estudios en los que se ha realizado oclusión de la ACM y se ha utilizado la técnica de aclaramiento de hidrógeno para apreciar que el FSC local es gradualmente reducido de la periferia al centro del territorio de dicha arteria (Marcoux et al., 1982).

Los estudios experimentales y las observaciones clinicopatológicas sugieren la existencia de una zona de necrosis neuronal selectiva en la zona de tejido aparentemente normal que rodea al infarto, que se ha llamado infarto incompleto o parcial y se asocia con pequeñas áreas de necrosis neuronal dispersas con preservación variable del neuropilo (Nedergaard et al., 1984) y desde luego no involucra los vasos sanguíneos (Graham, 1992). Lo que se ha denominado infarto completo sólo

representa uno de los estados finales de los diferentes cambios inducidos por la duración y la severidad de la isquemia (Nedergaard et al., 1984; DeGirolami et al., 1984).

La fisiopatología de la severidad en el límite anatómico del infarto se explica por los distintos umbrales de flujo para infarto, el umbral puede verse influido por la disponibilidad de  $O_2$  y  $C_6H_{12}O_6$  (Pulsinelli et al., 1982a; Graham, 1992). La demarcación severa del infarto puede explicarse alternativamente por un cambio repentino de flujo en el margen del infarto, ya que la perfusión es considerablemente incrementada en el periodo temprano después de la isquemia transitoria (Pulsinelli et al., 1982a; Nedergaard, 1988). Además la zona límite o las lesiones vertientes (Meyer, 1953; Zülch, 1953; Pulsinelli, 1985) son los mejores ejemplos de daño cerebral isquémico focal causado por la anatomía vascular. En tales lesiones, la necrosis isquémica ocurrió en la vertiente de las zonas del territorio arterial mayor y es mejor ejemplificada por el infarto de la zona límite entre la arteria cerebral anterior (ACA) y la ACM, donde la presión de perfusión es la más baja (Noback, Strominger y Demarest, 1993). Tales lesiones de la zona límite típicamente ocurren en episodios de hipotensión severa y han sido reportadas tanto en situaciones clínicas como en animales de experimentación (Brierley y Excell, 1966; Brierley, 1977; Marcoux et al., 1982; Nedergard et al., 1984; Pulsinelli, 1985; Graham, 1992).

Los mecanismos involucrados en el daño neuronal selectivo están íntimamente relacionados con las alteraciones metabólicas y electrofisiológicas que sufre el tejido isquémico, es decir participan la depleción energética, la acidosis láctica que al parecer es la característica más prominente de la conversión de la lesión neuronal selectiva al infarto, el aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  y los procesos enzimáticos que conllevan al daño celular y las excitotoxinas representadas principalmente por los neurotransmisores excitatorios Glu y Asp (Jorgensen et al., 1982; Nedergaard, 1988; Tanaka et al., 1993).

En los estudios experimentales se han descrito principalmente tres tipos de daño neuronal debidos a la isquemia-anóxia que son: proceso celular isquémico, muerte neuronal tardía y daño neuronal inducido por aminoácidos excitatorios (Graham, 1992). El estadio temprano del proceso celular

**Isquémico se caracteriza por la microvacuolización, seguida del estado de cambio celular isquémico con incrustaciones y finalmente cambios celulares homogeneizados y eventualmente desaparición de la neurona (Brierley et al., 1973; Graham, 1992). En relación con la muerte neuronal tardía se han observado dos tipos de cambios neuronales después de periodos de isquemia entre 5 y 30 minutos. En la situación isquémica breve, es decir de 5 a 10 minutos, se observaron cambios neuronales rápidos que correspondieron al proceso celular isquémico, mientras que con periodos más prolongados de isquemia (20 a 30 min) en estudios estructurales se observó desagregación de polirribosomas, incremento en el número de gránulos oscuros sueltos y acumulación de cisternas del retículo endoplásmico. Mientras que estos cambios se consideraron como una nueva forma de daño neuronal seguido de isquemia, la transición del proceso celular isquémico fue visto en las neuronas de la región CA1 del hipocampo. Después de 4 días del período de isquemia las neuronas de la región CA1 tuvieron daño neuronal irreversible. La muerte neuronal tardía en el hipocampo de la rata tiene ciertas similitudes con la cromatólisis central y sin embargo es causada por un proceso de daño neuronal primario (Hossmann y Zimmermann, 1974; Pulsinelli et al., 1982b; Petito y Pulsinelli, 1984; Graham, 1992). El daño neuronal inducido por los aminoácidos excitatorios se ha estudiado mediante la administración sistémica de éstos. Específicamente con el Glu, se ha observado que en la retina y el cerebro induce daño caracterizado por edema masivo agudo de las dendritas y de los procesos espinosos de las neuronas susceptibles, seguido por cambios degenerativos agudos de los organelos intracelulares y agrupamiento de la cromatina nuclear que rápidamente progresa a picnosis nuclear. Este proceso es agudo, los cambios dendrosomales aparecen a los 60 min de la administración sistémica del Glu. Debido a que los axones que pasan por la terminal del área dañada permanecen aparentemente normales, la lesión se ha denominado dendrosomatotóxica pero el axón limitado es un tipo de reacción histológica (Jorgensen et al., 1982; Schmidt-Kastner, Ophoff y Hossmann, 1990; Graham, 1992).**

Junto con los tipos de daño neuronal mencionados anteriormente se asocia la reacción glial. La mayor parte de la reacción de los astrocitos y de la microglia se presenta después de que las neuronas han mostrado el daño neuronal irreversible (i.e. después del estado de microvacuolización) y puede continuar por meses. Esta reacción es proporcional a la severidad de la destrucción neuronal. Es

decir, si la necrosis neuronal es moderada, la reacción glial también es moderada. Pero si es severa, la reacción es intensa y el tejido puede llegar a representarse por una cicatriz firme (esclerosis) en ciertas láminas de la neocorteza y ciertas zonas del hipocampo (Brierley et al., 1973; Petito et al., 1984; Gill, Nordholm y Lodge, 1992; Graham, 1992).

Como puede observarse, los astrocitos son importantes en la patogénesis de la lesión cerebral por isquemia. Ya que la isquemia casi instantáneamente dilata el citoplasma de los astrocitos, seguido alrededor de 40 min por incremento gradual de la densidad mitocondrial en el pie perivascular y varias horas más tarde en el citoplasma. Esta secuencia se asocia con el incremento rápido del  $K^+$  en el líquido extracelular (LEC). Se sospecha que los astrocitos con tasa alta de metabolismo basal son muy sensibles a la hipoxia. Interesantemente su tasa metabólica se incrementa durante la hipoxia, lo que refleja aumento en el consumo de  $O_2$  y  $C_6H_{12}O_6$  que está asociado con la hiperkalemia extracelular. Los astrocitos edematizados pueden tener efectos dañinos en la isquemia; uno de estos efectos es el incremento en la distancia de difusión del  $O_2$  del vaso sanguíneo a la neurona especialmente cuando se presenta edema astrocítico perivascular. Otro de los efectos puede ser el aumento paradójico en el consumo de energía en el tejido relativamente deficiente de energía. Estos efectos pueden concebir una espiral de propagación de falla energética por incremento tisular de la demanda energética y disminución neuronal del suplemento energético (Kaplan et al., 1987). Otras observaciones hechas con técnicas de microscopía reportan que la afinidad por la tinción ácida en la lesión isquémica celular ocurre en el momento en el que la integridad mitocondrial se pierde y la membrana celular se rompe. Estos cambios se observan en el microscopio electrónico. Estas alteraciones son representativas del estado del daño irreversible. Las alteraciones tempranas, tales como el encogimiento, la picnosis y la basofilia preceden a la acidofilia, y no son indicadores de lesión neuronal, puesto que estos cambios son completamente reversibles. La acidofilia de las células nerviosas es evidente después de 16 a 18 horas del insulto isquémico focal. La presencia de neuronas acidófilas es un indicador del daño neuronal definitivo. Las neuronas acidófilas desaparecen después de pocas semanas, y la infiltración de fagocitos persite (Petito et al., 1984; Nedergaard, 1988). En el infarto, las neuronas necróticas tienen ciertas características como son

**citoplasma eosinófilo, núcleo encogido y cromatina nuclear dispersa (Nedergaard et al., 1984; Torvik et al., 1986; Nedergaard, 1988).**

**Desde el punto de vista funcional también es importante considerar que la actividad eléctrica cerebral es responsable del 50% o más del consumo energético cerebral (Lutz et al., 1994), y que la reducción del FSC por debajo del 45% de lo normal es suficiente para alterar el estado de energía del tejido. Las evidencias sugieren que la ligadura bilateral de las arterias carótidas en ratas ligeramente anestesiadas se acompaña por cambios en las diferencias arterio-venosas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, lo que sugiere una reducción del 50% en el flujo sanguíneo en las partes supratentoriales del cerebro (Eklöf y Siesjö, 1972a; Eklöf y Siesjö, 1972b). Otros parámetros fisiológicos como son la presión arterial media (PAM) y las concentraciones de gases arteriales. en el caso de isquemia focal mediante electrocoagulación de ACM izquierda (Tyson, Teasdale, Graham, McCulloch, 1984) u oclusión de ACM (Uematsu, Greenberg, Reivich y Karp. 1988) y de isquemia global transitoria por oclusión de cuatro vasos (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli et al., 1982a; Pulsinelli et al., 1982b; Rosdahl, Seitzberg, Christensen, Balchen y Diemer, 1994), pinzamiento de arterias braquiocefálica y subclavia izquierda (Hossmann et al., 1974), pinzamiento de arterias carótidas más hipotensión de 50mm Hg a través de exsanguineación (Smith, Auer y Siesjö, 1984) o pinzamiento de arterias innominada y subclavia izquierda más hipotensión de 60-80mm Hg inducida mediante nitroprusiato de sodio (Schmidt-Kastner et al., 1990) han mostrado variaciones no significativas con respecto a los valores control. Desde luego que todas las situaciones isquémicas antes mencionadas son muy diferentes a la que se presenta en la isquemia global por paro cardiorrespiratorio (Pluta, Lossinsky, Mossakowski, Faso y Wisniewski, 1991; Cervantes, 1993).**

#### **1.1.4 Alteraciones secundarias a la reperfundión**

**Se han propuesto algunas hipótesis que tratan de explicar el daño celular que aparece subsecuente a la reperfundión, entre las que estan: Ames III, Wright, Kowada, Thurston y Majno, (1968) observaron que si se oclufan los grandes vasos del cuello por periodos de más de 7 min la**

recirculación cerebral inmediata se hacía progresivamente más difícil de obtener en proporción directa con el tiempo de la oclusión. Las causas aparentes fueron a) cambios en el estado de la sangre; b) reducción del calibre vascular, -específicamente la obstrucción multifocal de los precapilares, capilares y arteriolas cerebrales- que sucede por la RVC elevada (**vasoespasm**) y c) combinación de ambos factores. El estado que se establece por los cambios vasculares fue llamado **fenómeno de no reflujo** (Ames III et al., 1968; Plum, 1973 y Plum et al., 1982). Algunas explicaciones de este fenómeno son: a) el daño microvascular y la migración de los neutrófilos producen edema endotelial, con la consecuente ausencia de reflujo y b) la formación de agregados de plaquetas y trombos (Ames III et al., 1968; Tellez et al., 1996). Si la reperusión se presenta después del daño isquémico, ésta puede incrementar el FSC por un período breve y dar como resultado un tiempo más prolongado de disminución de flujo. Esta disminución de flujo llamada **hipoperfusión** resulta del aumento en la RVC así como de la PIC elevada. La oclusión vascular por factores mecánicos tales como el edema glial o endotelial y la agregación plaquetaria o de células sanguíneas rojas puede ser otra explicación de la hipoperfusión isquémica (Pulsinelli et al., 1982a).

Cuando el FSC se restablece después de un paro cardíaco, existe un período inicial de hiperemia que puede ser importante en la recuperación de la homeostasia iónica. La hiperemia puede resultar en parte porque se acumula adenosina en el espacio extracelular después de la isquemia y la adenosina es un potente vasodilatador. La hiperemia que sigue a la isquemia del SNC también puede estar asociada con incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y ésto a su vez puede contribuir al desarrollo del edema e incremento de la PIC (Pulsinelli et al., 1982a; Dearden, 1985; Krause et al., 1988; Cohan et al., 1989). La hiperemia cerebral notada inmediatamente después de la restauración de la circulación probablemente es inducida por la isquemia, que ocasiona acumulación extracelular de  $H^+$  a través de la formación de ácido láctico y por el flujo saliente de  $K^+$  de los depósitos intracelulares. Se sabe que ambos iones causan relajación del músculo liso cerebrovascular. Kuschisnky, Wahl, Bosse y Thurau en 1972 demostraron efecto aditivo de dichos iones en la producción de vasodilatación cerebral. A pesar de que los niveles de ATP cerebral disminuyen durante el período isquémico, la acumulación secundaria esperada de adenosina, también puede jugar un papel importante en la mediación de la respuesta hiperémica temprana

(Pulsinelli et al., 1982a). Petito (1979) describió dos cambios diferentes en la permeabilidad cerebral; el primero lo observó inmediatamente después de un período de 30 min de isquemia y que resultó en el incremento en el transporte de peroxidasa de rábano asociado con incremento en la pinocitosis de las células endoteliales vasculares cerebrales. Esto presumiblemente es un proceso que requiere energía de las células endoteliales y que pueden representar un intento de la vasculatura para compensar la disminución en la liberación del sustrato. El segundo cambio que observó Petito fue un incremento generalizado en la permeabilidad cerebral tanto para la peroxidasa de rábano como para el azul de Evans, lo que representa salida pasiva de los marcadores a través de la pared de los vasos necróticos (Petito, Pulsinelli, Jacobson y Plum, 1979; Pulsinelli et al., 1982a; Raichle, 1983).

En 1975 Ito, Spatz, Walker y Klatzo describieron un aspecto de "maduración" en el daño neuronal de gerbos sujetos a 15 min o más de oclusión unilateral de la arteria carótida. Este fenómeno de maduración, puede ser mejor definido en el sector H2 del hipocampo del gerbo, región que corresponde a la zona CA2 o CA3 de acuerdo con la terminología de Lorente de Nó (1934) y se caracterizó por un proceso que mostró acentuación de la tinción neuronal a las 20 horas de sobrevida y después necrosis neuronal severa en la misma población de neuronas de los animales que sobrevivieron una semana (Ito et al., 1975; Pulsinelli, 1985).

Otro aspecto importante que puede contribuir a la reperfusión microvascular desigual es la viscosidad sanguínea (Ames III et al., 1968; Kaplan et al., 1986). En estudios morfométricos llevados a cabo durante la etapa de recirculación se ha demostrado que la luz estrecha de los capilares corticales es el resultado del edema endotelial en ratas hiperglicémicas expuestas a isquemia cerebral incompleta severa durante 30 minutos. Las células endoteliales mostraron edema progresivo durante la recirculación. En animales normoglicémicos sólo se observaron cambios vasculares menores (Paljärvi, Rehncrona, Soderfeldt, Olsson y Kalimo, 1983; Nedergaard, 1988). Es decir, histopatológicamente el compromiso severo de la luz capilar se ha observado con altas concentraciones de lactato (Kaplan et al., 1986). Cuando las concentraciones de PCr, ATP y  $C_6H_{12}O_6$  disminuyen severamente, la concentración de lactato se incrementa en la neocorteza

**paramediana, el estriado dorso-lateral y la región CA1 del hipocampo de ratas expuestas a 30 minutos de isquemia mediante la oclusión de los cuatro vasos. Después de la reperfusión, las concentraciones regresan a niveles normales. En cambio, a las 6-24 horas de reperfusión, las concentraciones de PCr y ATP disminuyen, mientras que la de lactato se incrementa en el estriado; esto mismo ocurre en el hipocampo entre las 24-72 horas de reperfusión. La recuperación inicial y después la caída de estos metabolitos en estas zonas, coincide con el inicio y el progreso del daño morfológico en estas regiones cerebrales (Pulsinelli et al., 1983).**

Otras líneas de investigación que tratan de explicar el daño celular que aparece subsecuente a la reperfusión consideran al  $\text{Ca}^{2+}$  y a los radicales libres, ya que el flujo entrante masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperfusión inicia una cascada irreversible de eventos que incluye la generación de radicales libres de oxígeno y liberación de AGL (Uematsu et al., 1988; Téllez et al., 1996). Dichos mecanismos se explicaron anteriormente durante la fase 3 de la respuesta cerebral a la isquemia-anoxia.

Estudios recientes han demostrado que la reoxigenación se encuentra asociada con una disminución de la eficiencia en la transferencia de electrones a nivel de la NADH-CoQ oxidoreductasa (sitio 1 de la cadena respiratoria) en la membrana interna de la mitocondria además de un incremento en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial; este incremento puede ser dañino para la mitocondria, pues induce una marcada disminución de la fosforilación oxidativa (Moreno-Sánchez, 1985a, 1985b; Téllez et al., 1996), por lo que se ha especulado que la muerte celular ocurre cuando la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  produce la falla mitocondrial en la producción de ATP (Darle, Stone, Smith y Martin, 1991; Silverman, 1993; Téllez et al., 1996)

La reoxigenación después de isquemia transitoria no provoca cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, pero durante isquemia de larga duración ocurre acumulación neta de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y se observa entrada de éste a la mitocondria en el período de recirculación (Dienel, 1984; Téllez et al., 1996). Se ha encontrado un paralelismo en las regiones donde se acumuló  $\text{Ca}^{2+}$  y donde hubo daño cerebral por isquemia. Sin embargo, no se ha podido discernir si la acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  precede a la necrosis neuronal o solamente ocurre como consecuencia del daño celular. En ratas, la

**acumulación y retención de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cerebro posisquémico fue selectiva y tiempo-dependiente. El patrón regional de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se correlacionó con la progresión temporal del daño celular isquémico (Dienel, 1984; Tsubokawa et al., 1995; Tellez et al., 1996).**

**Las evidencias de la participación de los radicales libres en el daño por isquemia-reperusión en el cerebro son indirectas. Su presencia se ha relacionado con la activación de la lipoperoxidación, la alteración de los componentes fosfolipídicos membranales, los cambios en los niveles internos de los atrapadores endógenos de radicales libres y por el efecto protector de los atrapadores exógenos (Yoshida et al., 1980; Wieloch y Siesjö, 1982; Watson et al., 1984; Téllez et al., 1996). El daño oxidativo a los lípidos de las membranas ha sido asociado con la isquemia cerebral. Las reacciones de Fenton que ocurren durante la reperusión se han implicado en el proceso oxidativo. La reacción de Fenton se refiere a la formación de radicales libres de oxígeno como el ion hidroxilo a partir de la interacción del hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) con el radical libre superóxido. Durante este período se ha reportado incremento de los radicales libres que provoca lipoperoxidación (Yoshida et al., 1985; Téllez et al., 1996). El cerebro es un blanco preferencial para el proceso de peroxidación ya que tiene un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados y como la lipoperoxidación es un proceso que depende de la presencia de iones  $\text{Fe}^{2+}$  (Halliwell y Gutteridge, 1984; Téllez et al., 1996), ciertas áreas del cerebro como el cuerpo estriado y el hipocampo, que son ricas en  $\text{Fe}^{2+}$ , parecen ser particularmente vulnerables a la lipoperoxidación membranal y a la isquemia cerebral (Zaleska y Floyd, 1985; Téllez et al., 1996).**

**A estas dos últimas hipótesis sobre el daño por isquemia-reperusión se les han denominado paradojas, pues resulta contradictorio que siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{O}_2$  esenciales para la liberación de NTS y la respiración celular, sean dañinos para la célula durante la reperusión (Tellez et al., 1996).**

**Recientemente se ha postulado una hipótesis que podría tener un papel muy importante para el establecimiento del daño por reperusión, la Paradoja del Protón. Este modelo postula que durante la isquemia, en la célula se ponen en marcha mecanismos anaeróbicos que incrementan la producción de  $\text{H}^+$  (producción de ácido láctico e hidrólisis de ATP), lo que induce la activación del intercambiador  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  de la membrana plasmática, que da como resultado un aumento en la**

concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular; esta alta concentración de  $\text{Na}^+$ , estimula la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e induce un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Scholz y Albus, 1993; Alvarez et al., 1994; Tellez et al., 1996).

Existen evidencias que indican que el daño tisular ocasionado por isquemia-reperfusión está asociado con la acumulación de neutrófilos activados. Los radicales libres producidos durante la perfusión intervienen en la actividad quimiotáctica de los neutrófilos. Una vez que se han adherido al endotelio, los neutrófilos secretan especies reactivas de  $\text{O}_2$  adicionales, además de enzimas proteolíticas como la elastasa (Welbourn, Golman y Paterson, 1991; Téllez et al., 1996). Al parecer, los productos del ácido araquidónico tienen gran importancia en el daño por perfusión, ya que su producción aumenta de manera importante durante este período (Ernster, 1988; Téllez et al., 1996). Se han propuesto dos mecanismos: 1) el ácido araquidónico y sus productos como el leucotrieno  $\text{B}_4$  y el tromboxano  $\text{A}_2$  (como resultado del aumento en la actividad de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa), que actúan como moléculas quimiotácticas induciendo la adhesión de los neutrófilos al endotelio y 2) los productos del ácido araquidónico, principalmente el leucotrieno  $\text{B}_4$ , son potentes estimuladores para la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de elastasa de los neutrófilos (Gimbrome, Brock y Schafer, 1984; Smedly, Tonnesen, Sandhaus et al., 1986; Téllez et al., 1996).

Los radicales peróxido libres son capaces de contribuir de manera importante al daño irreversible de los componentes membranales de las neuronas y de las cadenas de ADN. La ruptura de una o las dos cadenas del ADN también puede ocurrir como consecuencia de la actividad de nucleasas debida al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular que provoca la consiguiente alteración de la síntesis de proteínas funcionales y estructurales que puede provocar daño neuronal irreversible en el término de varios días post-isquemia (Cervantes, 1993).

### **1.1.5 Vulnerabilidad selectiva**

Los trabajos de Spielmeyer (1925), Meyer (1936), Vogt y Vogt (1937) y Scholz (1953) son responsables del concepto de que regiones cerebrales específicas pueden ser más vulnerables al daño isquémico que otras. Spielmeyer (1925) sugirió que la particularidad del abastecimiento vascular local facilita la insuficiencia vascular de regiones tales como el hipocampo. En contraste, los Vogts (1937) hipotetizaron las propiedades fisicoquímicas de neuronas específicas que las hacen más susceptibles a la hipoxia-isquemia. Scholz (1953, 1963) en un intento por unificar estas opiniones, recapituló la evidencia con la que demostró que bajo condiciones fisiopatológicas específicas el daño cerebral de isquemia focal puede ser atribuido primeramente a las particularidades vasculares anatómicas mientras que bajo otras condiciones el patrón del daño cerebral sólo puede ser explicado por las propiedades únicas de las células mismas. Hay una alta variedad de lesiones cerebrales focales isquémicas que son independientes de la distribución vascular y que sólo pueden explicarse por las propiedades físicas y químicas únicas de las células afectadas (Pulsinelli, 1985; Graham, 1992). Existen diferentes teorías para explicar porque algunas regiones cerebrales son más vulnerables que otras a la isquemia. Ames III et al., en 1968 sugirieron que se debe al empeoramiento del reflujo en las áreas afectadas. Myers (1979) mostró que ciertas estructuras nucleares en el tallo cerebral que desarrollaron lesiones isquémicas tempranas tenían un alto contenido de glucógeno y sugirió que la vulnerabilidad se debió a acumulación excesiva de ácido láctico en estas regiones.

**Las regiones cerebrales selectivamente vulnerables a la lesión isquémica completa o incompleta en animales en ayuno fueron aquellas con altas reservas de glucógeno (Kaplan et al., 1987).**

**La idiosincracia regional del FSC y del metabolismo en el período posisquémico son dos factores que pueden explicar la mayor sensibilidad de ciertas neuronas al daño isquémico así como la naturaleza progresiva del daño neuronal en algunas regiones cerebrales. Por estudios realizados se sabe que el metabolismo cerebral disminuye en el cerebro posisquémico, pero el grado de reducción**

varía considerablemente, en algunas regiones la disminución transitoria del metabolismo cerebral es mayor que en el tejido adyacente (Pulsinelli et al., 1982a).

En 1975 se introdujo el concepto de excitotoxicidad para tratar de explicar la vulnerabilidad selectiva de ciertas áreas cerebrales (Martínez, 1991). Los NTS excitatorios pueden ser un factor que explique las diferencias de vulnerabilidad de cada una de las regiones del cerebro; por ejemplo, la gran vulnerabilidad al daño del cuerpo estriado durante la isquemia-anoxia ha sido relacionada con lo lento que desaparece la glicina del medio extracelular, la cual es un activador alostérico del receptor NMDA (Lutz et al., 1994).

Muchas investigaciones indican una entrada particularmente alta de Glu en los campos dendríticos altamente vulnerables de las células piramidales en el hipocampo y de las células de Purkinje en la corteza cerebelosa (Cotman et al., 1981; Meldrum, 1981; Jorgensen et al., 1982). Meldrum (1981) y Siesjö (1981) notaron que las neuronas de la región CA1 del hipocampo pueden tener alta conductancia dendrítica al  $\text{Ca}^{2+}$  (Schwartzkroin y Wyler 1980) y sugirieron que la vulnerabilidad puede deberse a un flujo entrante excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o a un desbalance entre la excitación y la inhibición (Jorgensen et al., 1982). Hay estudios en los que se ha observado acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región CA1 del hipocampo tras un episodio de isquemia, por lo que se ha supuesto que los procesos celulares anormales debidos a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pudieran ser los responsables de la muerte neuronal (Araki et al., 1990; Tellez et. al, 1996).

La vulnerabilidad selectiva de algunas neuronas puede considerarse por los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en sus membranas celulares así como por los umbrales de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dearden, 1985). Aunque muchas veces se ha propuesto que las preferencias en la susceptibilidad resultan de diferencias en la suficiencia vascular, se ha observado que por ejemplo el paro cardiaco que produce isquemia completa uniforme ocasiona distribución heterogénea de lesiones. Además diferentes tipos de lesión producen diferentes patrones de lesión en animales similares y ésto siempre hace una diferencia notable entre las células adyacentes y el grado de lesión. Es un hecho que las áreas vulnerablemente selectivas son siempre las que mantienen niveles altos de flujo sanguíneo.

La vulnerabilidad selectiva resulta entonces de: a) diferencias en los niveles celulares y b) el compromiso vascular que probablemente ocurre durante el período de reperfusión, presumiblemente por los cambios asociados con isquemia y reperfusión (Kaplan et al., 1987). En el sector CA1 del hipocampo la vulnerabilidad selectiva se explica por la alta concentración del receptor NMDA en dicha región (Martínez, 1991; Gutiérrez, 1991).

Entre las neuronas hay una mayor jerarquía de susceptibilidad al daño isquémico (Brierley, 1977; Brown, 1977). Las células piramidales CA1 del hipocampo y las células de Purkinje del cerebelo parecen ser las neuronas más altamente susceptibles del cerebro seguidas en orden por las neuronas estriatales de tamaño medio y las neuronas neocorticales de las láminas 3, 5 y 6.

Dentro de las estructuras antes mencionadas hay orden de vulnerabilidad neuronal a la isquemia:

Hipocampo: CA1, CA4 > CA3 > células granulares

Cerebelo: Purkinje > células estrelladas y en cesta > células granulares > células de Golgi

Estriado: neuronas de tamaño pequeño y mediano > neuronas grandes

Neocorteza: láminas 3, 5 y 6 > láminas 2 y 4 (Pulsinelli, 1985).

## Hipocampo

### 1.2.1 Generalidades y organización anatómica

La formación hipocámpica forma parte del arquipalio que corresponde a la corteza filogenéticamente más primitiva del telencéfalo (Noback y Demarest, 1981; Netter, 1991). Inicialmente está dispuesta formando una estructura arqueada en la parte dorsomedial del hemisferio cerebral, que se extiende desde el agujero interventricular hasta la parte rostral de la prolongación temporal del ventrículo

lateral (López Antunez, 1979; Carpenter, 1986; West, 1986). Las formaciones hipocámpicas de ambos lados se relacionan por medio de fibras que pasan por la lámina terminal y forman parte de la comisura anterior. Al producirse el gran desarrollo del neopalio, se establecen conexiones interhemisféricas masivas a través de la comisura anterior y especialmente del cuerpo caloso, que constituye la comisura neopalial más importante (López Antunez, 1979; Noback et al., 1981; Willis y Grossman, 1981; Carpenter, 1986; Netter, 1991). El desarrollo del cuerpo caloso produce profundas modificaciones en la formación hipocámpica, la cual es desplazada hacia la parte ventral del hilio hemisférico para quedar finalmente situada 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 continua 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 (López Antunez, 1979; Noback et al., 1981; West, 1986).

El hipocampo es la parte de la formación hipocámpica que debe su nombre a su forma similar a un caballo de mar. Es una estructura cilíndrica curvada cuyo eje ventro-dorsal forma un semicírculo alrededor del tálamo. Se extiende de la terminación rostral del cuerno inferior del ventrículo lateral a la parte posterior del cuerpo caloso (esplenio) (Noback et al., 1981; Netter, 1991).

Como todo el arquipalio, el hipocampo comprende tres regiones: el giro dentado (vecino a la cisura coroidea), el hipocampo, asta o cuerno de Ammon (campos CA) (intermedia) y adyacente al hipocampo está el complejo subicular, (contiguo al neopalio) (López Antunez, 1979; Noback et al., 1981; Netter, 1991;). La corteza del giro dentado y el hipocampo pueden ser visualizados como dos "Vs" ensambladas (Escobar, 1986) (Fig. No. 5).

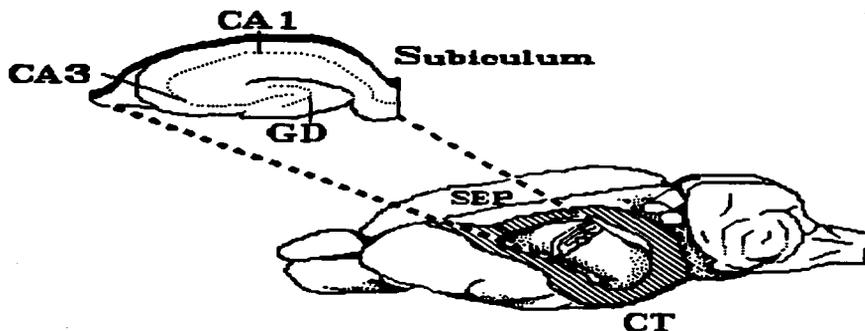


Fig. No. 5 Topografía del hipocampo de la rata (campos CA1 y CA3 de la capa de células piramidales. El eje longitudinal o septotemporal va desde el núcleo septal (SEP) a la corteza temporal (CT). El eje transversal está orientado perpendicular al eje septotemporal. GD = giro dentado. (Tomada de Bravo, 1991; Galindo, 1991).

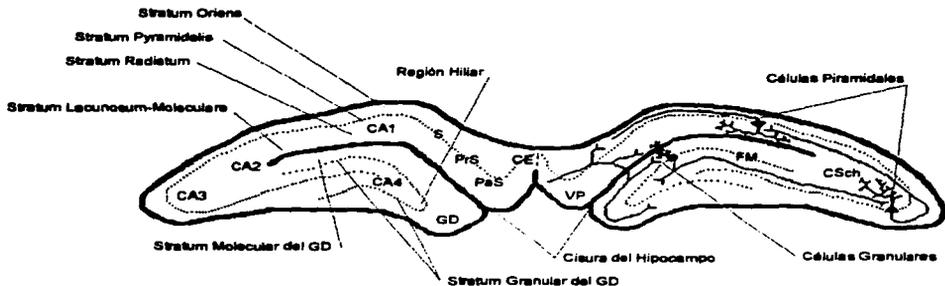
El hipocampo y el giro dentado son estructuras laminadas formadas por tres capas. El subiculum y la corteza entorrinal son la transición entre el hipocampo y las estructuras neocorticales formadas por seis láminas. La región presubicular no está rigurosamente separada del área retrosplenial o neopallio (Willis et al., 1981; Brainteberg y Schüz, 1983; Carpenter, 1986; Wyllie, 1993).

El giro dentado (GD) o fascia dentata debe su nombre a la apariencia dentada que muestra, la cual es causada en parte por una serie de arterias perforantes que tienen su origen en las arterias coroideas

anterior y posterior y que penetran a todo lo largo del giro (Willis et al., 1981; Wyllie, 1993). Existen varias nomenclaturas para las porciones del giro dentado. La porción adyacente a la fisura hipocampal se designa sección suprapiramidal. A la porción opuesta se denomina sección infrapiramidal, y a la parte donde se conectan se designa cresta (Witter, 1989; Bravo, 1991). El GD tiene una estructura trilaminar, constituida por las capas molecular o superficial (*stratum moleculare*), granular o intermedia (*stratum granulosum*) y polimórfica o profunda (el *hilus*) (Kappers, Huber y Crosby, 1967; Gaarskjaer, 1978; Amaral, 1978; Willis et al., 1981; Shephred, 1990; González, 1995) (Fig. No. 6).

El GD contiene neuronas de axón corto (Golgi tipo II), cuyos axones y dendritas se distribuyen dentro de la misma capa en que están situadas (López Antunez, 1979; Amaral y Dent, 1981; Wyllie, 1993). Algunas células de la capa granular dan origen a axones que además de emitir colaterales para las neuronas de la capa polimórfica, llegan hasta el asta de Ammon y en su curso se ponen en relación con las dendritas apicales de las células piramidales en el estrato radiado; a estos axones se les llama **fibras musgosas** por la gran cantidad de varicosidades que presentan (Fig. No. 6). Otros axones de las células de la capa granular llegan hasta el alveus para incorporarse posteriormente a la fimbria (Kappers et al., 1967; Gaarskjaer, 1978; Amaral et al., 1981; Wyllie, 1993).

Al considerar las características arquitectónicas y conexiones de la formación del hipocampo, Lorente de Nó (1934) subdividió el asta de Ammon o corneo ammonis (CA) en varios campos: CA1 o regio superior (Cajal, 1955), CA2, CA3 (a,b,c) o regio inferior (Cajal, 1955) y CA4 (Bayer, 1985). Con otra terminología se denomina del campo H1 al H5 (Rose, 1927), y de acuerdo con la terminología anterior corresponde a: H1 incluye los campos CA1, CA2 y CA3a y b, H2 corresponde al CA3c, y del H3 al H5 se incluyen el CA4 y la región hiliar (Brown et al., 1979; Willis et al., 1981; Pulsinelli, 1985). La porción anterior del hipocampo está irrigada por la arteria coroidea anterior (Brust, 1991), mientras que la mitad posterior de la formación del hipocampo la irriga la arteria coroidea posterior (Netter, 1991) o la arteria cerebral posterior (Graham, 1992). Todas estas arterias son ramas de vasos arteriales de mayor calibre originados de las arterias carótidas internas (Zeman y Maitland, 1963; Marinkovic, Milisavljevic y Vuckovic, 1991; Graham, 1992).



**Fig. No. 6 Regiones de la formación del hipocampo.** Del lado izquierdo se muestra la parte ventral formada por el giro dentado (GD), la región hiliar, la capa o *stratum* granular y la capa o *stratum* molecular. También se señala el hipocampo propiamente dicho y sus diferentes campos CA1 a CA4, así como sus principales capas: *stratum oriens* o capa polimórfica, *stratum pyramidalis*, *stratum radiatum* y *stratum lacunosum- molecular* (capa más profunda). La parte sagital está formada por el Subículo (S) que se divide en Parasubículo (PaS) y Presubículo (PrS) y la Corteza Entorrinal (CE). En el lado derecho se muestran los circuitos neuronales. La CE manda sus fibras a través de la vía perforante (VP) y hacen contacto sináptico en el tercio superior del árbol dendrítico de las células granulares, éstas a su vez envían sus prolongaciones, llamadas fibras musgosas (FM) hacia las células piramidales del campo CA3. Los axones de las células piramidales de CA3 dan lugar a una fibra recurrente colateral llamada colateral de Schaffer (CSch) que hace contacto sináptico con los campos CA2 y CA1 (Tomada de Bravo, 1991; Galindo, 1991).

En el asta de Ammon se reconocen los siguientes estratos a partir de la superficie ventricular: el *alveus* que en su mayor parte se constituye de sustancia blanca, por el cursan fibras aferentes que llegan al hipocampo de otras regiones, y eferentes constituidas por los axones de las células piramidales del hipocampo y que parten de él (Galindo, 1991; Parra, 1995). La capa polimórfica también llamada *stratum oriens* donde además de fibras aferentes y eferentes, se hallan células en cesta y otras pequeñas células de forma variable cuyos axones se dirigen en su mayor parte a los estratos más profundos (Galindo, 1991; Parra, 1995) (Fig. No. 6). La lámina piramidal o *stratum pyramidalis* que contiene la mayor densidad neuronal formada por 3 o 4 hileras de células piramidales (Kappers et al., 1967; Willis et al., 1981; Parra, 1995). El estrato de células piramidales presenta 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. La porción de la lámina piramidal que contiene las arborizaciones de las dendritas apicales de estas células forman el *stratum radiatum* y el soma de las células tiende a formar el *stratum piramidal o lúcido*, que está bien desarrollado en el área CA3 (Cajal, 1955; Kappers et al., 1967; Gaarskjaer, 1978; Amaral et al., 1981; Bravo, 1991; Wyllie, 1993). De la base del soma de las células piramidales parte el axón que después de cursar por el estrato oriens y el alveus pasa a la fimbria y posteriormente al fórnix que constituye la principal vía eferente del hipocampo (Cajal, 1955; Gaarskjaer, 1978; Amaral et al., 1981; Bravo, 1991; Galindo, 1991). Las neuronas piramidales del área CA3 son muy largas y sus axones dan unas fibras colaterales recurrentes llamadas **colaterales de Schaffer**, que penetran al estrato lacunoso-molecular donde hacen sinápsis con las dendritas apicales de otras células piramidales y conectan al campo CA3 con el campo CA1 (Cajal, 1955; Kappers et al., 1967; Simonsen, 1973; Gaarskjaer, 1978; Amaral et al., 1981; Willis et al., 1981; Witter, 1989; Wyllie, 1993) (Fig. No. 6). A continuación sigue el estrato radiado en el que se arborizan las dendritas apicales de las células piramidales. El *stratum lacunosum* formado por muchas células esparcidas y un gran número de fibras, algunas originadas desde la región inferior del hipocampo y llegan al subículo. Algunas de estas fibras son colaterales de las células piramidales. Otras fibras de origen desconocido entran al estrato lacunoso desde la sustancia blanca (*alveus*) inferior y conducen procesos entre las células de la capa piramidal a las células de este estrato (Parra, 1995). La lámina o *stratum moleculare* es el más profundo y contiene las

ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las células piramidales, interneuronas diseminadas y fibras que llegan al hipocampo desde el subículo y que corren paralelas y a corta distancia en dirección de este estrato (López Antunez, 1979; Issacson, 1982; Walle, 1987; Galindo, 1991; Parra, 1995).

Al complejo subicular se le consideran varias partes que son: el prosubiculum, que es la región más cercana al campo CA1, y adyacente al prosubiculum están el subiculum, presubiculum (área 27) y el parasubiculum (área 49) (Fig. No. 6). Otra estructura estrechamente relacionada e interconectada con la formación hipocámpica es la corteza entorrinal (área 28) que en la rata, con criterio citoarquitectónico se divide en lateral (CEL) y medial (CEM) (Blackstad, 1956; Steward, 1976; Wyss, 1981; Witter, 1989). La corteza entorrinal forma parte del giro parahipocámpico y se localiza justo adyacente al parasubiculum. El prosubiculum está separado de la fascia dentada por la cisura hipocámpica (López Antunez, 1979; Bayer, 1985).

A las neuronas del CA1 también se les conoce como *sector de Sommer*, dado que fue el primero en demostrar la alta vulnerabilidad de estas células a la anoxia, isquemia y epilepsia (Sommer, 1880; López Antunez, 1979; Willis et al., 1981; Escobar, 1986; Wyllie, 1993), mientras que el *sector de Bratz* corresponde a los campos CA3 y CA4 (Willis, et al, 1981; Escobar, 1986).

### 1.2.2 Citoarquitectura y electrofisiología

Los elementos celulares que constituyen la formación del hipocampo son principalmente de tres tipos: células piramidales, células granulares e interneuronas.

Las células piramidales constituyen los elementos citológicos más importantes del hipocampo, forman un estrato bien desarrollado (*stratum pyramidale*) (Kappeler et al., 1967; Willis et al., 1981; Escobar, 1986; Wyllie, 1993). Tienen somas de forma piramidal con base de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y altura de 40 a 60  $\mu\text{m}$ . Se identifican dos tipos: a) neuronas de árbol dendrítico corto que tienden a ubicarse

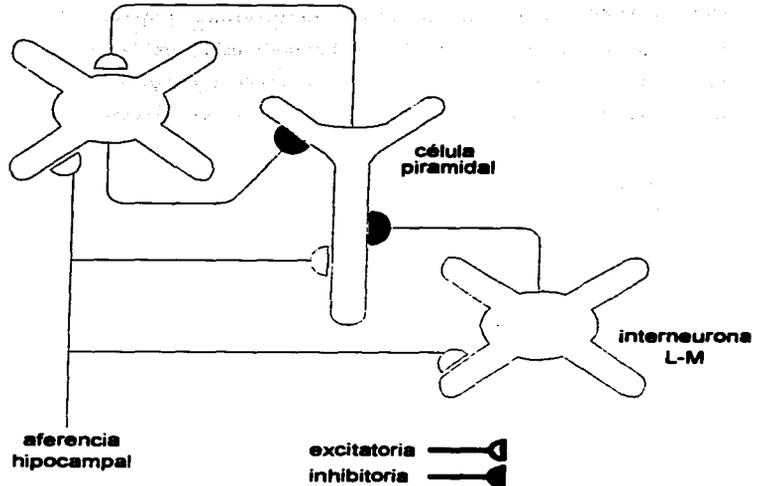
en la parte superior del estrato, su dendrita apical es corta, tienen gran número de espinas dendríticas y su arborización apical y basal es muy ramificada; b) neuronas de árbol dendrítico largo, se ubican en la parte inferior del estrato, tienen una dendrita apical larga, un número pequeño de espinas dendríticas y su arborización apical y basal es menos ramificada (Shephred, 1990; Parra, 1995; González, 1995). Desde el punto de vista electrofisiológico Kandel, Spencer y Brinley (1961) identificaron mediante la estimulación intracelular antidrómica (fornix), ortodrómica (subiculum) y directa (mediante el paso de corriente a través de un electrodo) poblaciones celulares de los campos CA2, CA3 y algunas de CA4 y con base en la respuesta que obtuvieron clasificaron a las células piramidales en dos tipos: 1) neuronas piramidales identificadas y 2) neuronas piramidales no identificadas. Ambos tipos celulares mostraron propiedades similares. El potencial de membrana de las células identificadas fue de  $52.0 \pm 2.11$  mV y el de las células no identificadas de  $46.5 \pm 2.04$  mV. En ambos grupos el valor máximo del potencial de acción fue de 110 mV con una media de 70 mV para las células identificadas y de 57.4 mV para las no identificadas. La duración de la espiga fue de  $1.84 \pm 0.085$  mseg y de  $1.82 \pm 0.058$  mseg para las neuronas identificadas y las no identificadas respectivamente. La estimulación de la vía antidrómica activa poderosamente el sistema de axones colaterales de inhibición recurrente (Kandel et al., 1961).

Las células granulares constituyen la población principal del giro dentado, se consideran neuronas piramidales algo mal desarrolladas (Kappers et al., 1967; Willis et al., 1981; Wyllie, 1993). Su soma mide entre 10 y 15  $\mu$ m, tienen una o varias dendritas y sus axones forman haces denominados *fibras musgosas* que se proyectan a las dendritas apicales de CA3 (Escobar, 1986; Shephred, 1990; Parra, 1995; González, 1995).

Mediante estudios electrofisiológicos se ha determinado que hay neuronas intrínsecas inhibitorias dentro del hipocampo que son activadas por las descargas de las neuronas piramidales. Estas neuronas son las células en cesta y producen potenciales postsinápticos inhibitorios (PPSI), mientras que la excitación del fornix provoca potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) (Escobar, 1986).

Las interneuronas están diseminadas en toda la formación hipocámpica. Se han descrito varios tipos, Cajal en 1955 y Lorente de Nó en 1934 describieron dos tipos de células en cesta en el giro dentado. Sus somas se encuentran al margen de la región hiliar con la capa de células granulares (células en cesta fusiformes) o bien incluidas en esta última (células piramidales), miden de 15 a 30  $\mu\text{m}$ , tienen dendritas cortas de 3 a 6  $\mu\text{m}$  y con pocas espinas. Ambas envían sus axones dentro de la capa de células granulares para formar un plexo en cesta con los somas de estas células; además, tienen una dendrita apical que asciende hacia la capa de células granulares y dendritas basales que corren a lo largo del borde hiliar o penetran al *hilum* (González, 1995). Las interneuronas conocidas como células musgosas se distribuyen principalmente en la región hiliar (Amaral, 1978; Parra, 1995) y aunque su morfología suele ser variada (Ribak y Seress, 1983), principalmente se han reconocido dos tipos de ellas, las multipolares y las fusiformes (Buckmaster, 1993; Parra, 1995). Existen otros tipos de interneuronas que forman circuitos locales en el giro dentado (Shephred, 1990) con somas dentro de la capa de células granulares y el tercer tipo de interneuronas tienen su soma en la capa molecular. Este último tipo de células se encuentran en la región dorsal y ventral de la capa molecular, adyacente a la capa de células granulares y tienen un campo dendrítico multipolar (Shephred, 1990; González, 1995). Otro tipo de interneuronas son las células GABAérgicas, que se encuentran distribuidas ampliamente en todo el hipocampo (Parra, 1995), aunque su densidad es mayor en el GD donde se localizan subyacentes o dentro de la capa de células granulares y en la región molecular dorsal (González, 1995). En la región CA1 se han identificado 3 tipos de interneuronas: interneuronas en cesta (B), interneuronas oriens/alveus (O/A) e interneuronas lacunoso-molecular (L-M), estas interneuronas son todas inhibitoras (Lacaille, Kunkel y Schwartzkroin, 1989). Las células en cesta y las oriens/alveus median la inhibición por anteroalimentación o *feedforward* y por retroalimentación o *feedback* sobre las células piramidales de CA1, mientras que las interneuronas L/M parecen mediar solo la inhibición *feedforward* (Fig. No. 7) (Lacaille et al., 1989).

célula en cesta  
o interneurona O/A



**Fig. No. 7** Diagrama que ilustra algunas conexiones del hipocampo. Las aferencias al hipocampo hacen sinápsis con células piramidales y no piramidales y van a mediar la inhibición anterógrada. Las células piramidales hacen contactos sinápticos con las interneuronas O/A pero no con las interneuronas L-M. Las interneuronas O/A establecen el circuito de inhibición recurrente a través de una colateral de la célula piramidal. Las L-M también forman un circuito inhibitorio con la célula piramidal. (Tomada de Lacaille et al., 1989).

Muchos tipos de 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 (aproximadamente  $45 \mu$  de diámetro) tienen dendritas basales que llegan hasta el estrato oriens y dendritas apicales que ascienden dentro del estrato radiado y lacunosomolecular. Sus axones proyectan lateralmente por varios cientos de micras y dan muchas colaterales que entran en el estrato piramidal y forman plexos

parecidos a cestas alrededor del soma de la célula piramidal. Las células en cesta contienen núcleos de forma irregular, retículo endoplásmico denso y numerosos orgánulos, sus dendritas son espinosas (o con espinas escasas), parecen burbujas (tienen abultamientos periódicos) y reciben muchos contactos sinápticos. Los procesos axonales también muestran alargamientos periódicos (varicosidades) y terminan en contactos sinápticos simétricos. Muchas de estas interneuronas son GABAérgicas, tienen potenciales de acción breve (0.8 mseg), una constante de tiempo corta (aprox 3 mseg) y espigas grandes después de la hiperpolarización (5 a 10 mV; 10-30 mseg). Responden a la despolarización somática con un tren de potenciales de acción que no disminuye y es seguido por un período de hiperpolarización de larga duración (100-800 mseg). En el potencial de reposo las células en cesta disparan espontáneamente potenciales de acción a una frecuencia alta y muestran un bloque constante de PPSE (Lacaille et al., 1989). Las células en cesta se encuentran bajo control sináptico de las colaterales de Schaffer y de las fibras comisurales (estrato radiado). Su estimulación provoca un PPSE seguido por un PPSI. Los PPSE de las interneuronas llegan a tener un pico más rápido que los PPSE de las células piramidales provocados por los mismos sitios de estimulación. Cuando se incrementa la intensidad del estímulo el PPSE usualmente desencadena una descarga de potenciales de acción. Dado que las células en cesta son excitadas con más corta latencia que las células piramidales, las primeras pueden ser activadas por *feedforward* con respecto a las células piramidales. Las células piramidales excitan a las células en cesta y las células en cesta inhiben a las células piramidales por feedback. Estos resultados muestran directamente una vía de inhibición recurrente (*feedback*) de las interneuronas a las células piramidales. Las células en cesta tienen contactos sinápticos principalmente con el soma de las células piramidales y también con las dendritas proximales y basales de las células piramidales. También tienen contacto con procesos dendríticos de otras interneuronas (Fig. No. 7) (Lacaille et al., 1989).

Las interneuronas que se encuentran en el estrato oriens-alveus tienen axón horizontal, su soma es multipolar, con 20 a 30  $\mu$  de diámetro y se localizan en el borde de este estrato. El axón de estas interneuronas se ramifica profusamente en el estrato oriens y piramidal y muestra inmunoreactividad para GABA y para el factor inhibidor de la liberación de somatotropina. Las interneuronas O/A reciben sinápsis excitatorias de las células piramidales del CA3 ipsilateral y contralateral. La

respuesta sináptica excitatoria es más poderosa en las interneuronas O/A que en las células piramidales y tienen potenciales de acción que descargan con latencia corta. Esto indica que las interneuronas O/A son excitadas mediante *feedforward* más rápida con respecto a las células piramidales. Las interneuronas O/A inhiben a las células piramidales del CA1 mediante hiperpolarización lenta y a las piramidales del CA3 rápidamente (Lacaille et al., 1989).

Las interneuronas L-M se encuentran en el borde del estrato lacunoso-molecular y penetran intracelularmente en el estrato radiado de la región CA3. Por la morfología de su soma (fusiforme y multipolar) y de sus dendritas, las interneuronas L-M son similares a las células estrelladas del estrato lacunoso descritas por Cajal en 1955 y por Lorenté de Nó en 1934. Las extensiones dendríticas y las proyecciones axonales se han encontrado con árboles dendríticos que se expanden de la segunda a la tercera parte de la región CA1 y a parte de la fascia dentada. Las dendritas son más uniformes y en forma de rosario, proyectan al exterior del soma a través del estrato lacunoso-molecular. Algunas dendritas se proyectan en el estrato radiado, donde se ramifican y ocasionalmente se continúan a través del estrato piramidal y hacia el estrato oriens. Otras dendritas suben hacia el estrato lacunoso-molecular y cruzan la fisura hipocampal hacia la capa molecular del GD. Los axones que emergen usualmente cerca de una dendrita primaria en el estrato lacunoso-molecular son varicosos y envían proyecciones a unos milímetros a través de la capa L-M. Los axones se ramifican inmediatamente alrededor y en el estrato radiado. Algunos procesos axonales se ramifican en el estrato piramidal y en el estrato oriens. Las proyecciones axonales no se restringen a la región CA1, algunas colaterales del axón ascienden hasta el estrato lacunoso-molecular, atraviesan la fisura hipocampal y cursan entre la capa molecular de la fascia dentada. Las interneuronas L-M son similares a otras células no piramidales con muchos contactos sinápticos en sus dendritas espinosas (Lacaille et al., 1989).

Los registros intracelulares para las interneuronas L-M revelaron propiedades membranales características. En forma similar a otras interneuronas y en contraste con las células piramidales, la resistencia de entrada de la membrana es más alta (64 M $\Omega$ ), una hiperpolarización posterior prominente sigue a cada potencial de acción y hay poca acomodación a la frecuencia durante los

pulsos de corriente despolarizante. Al igual que las células piramidales, la amplitud del potencial de acción es grande (64 mV) y su duración es larga (2.0 mseg), la constante de tiempo relativamente lenta (8.6 mseg), los disparos espontáneos no se presentan o son muy escasos y hay poca actividad sináptica espontánea (Lacaille et al., 1989).

Aferentes tanto excitadoras como inhibitoras inciden en las interneuronas L-M, con PPSE y PPSI provocados por la estimulación de las principales vías de fibras del hipocampo. Así como en las interneuronas en cesta y en las O/A, la excitación sináptica de las interneuronas L-M es más rápida que la excitación de las células piramidales, debido también probablemente a un mecanismo de feedforward. Adicionalmente y conforme con las observaciones anatómicas de las dendritas de las interneuronas L-M en la fascia dentada, la estimulación de la capa molecular del giro dentado provoca un PPSE en las interneuronas L-M. Las aferencias excitadoras e inhibitoras tienen diferentes orientaciones. Las fibras aferentes excitadoras corren transversas al eje septotemporal del hipocampo, mientras que las aferentes inhibitoras corren en orientación longitudinal. Las aferentes excitadoras aparentan tener una trayectoria laminar y las aferencias inhibitoras una trayectoria interlaminar (Lacaille et al., 1989).

Las fibras aferentes excitadoras a las interneuronas L-M son las colaterales de Schaffer, las fibras comisurales y las de la corteza entorrinal ipsilateral. El origen de las aferentes inhibitoras 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 glutamato descarboxilasa (GAD) positivos en las interneuronas L-M de la región CA3, la inhibición en las interneuronas L-M de la región CA1 es muy probable que se origine en otras interneuronas inhibitoras de la misma región (Lacaille et al., 1989)

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 postsinápticas provocadas en las células piramidales. Los PPSI 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 del PPSI 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 (Lacaille et al., 1989).

Las interneuronas L-M tienen contactos sinápticos con células piramidales e interneuronas de la región CA1. Los contactos sinápticos axodendríticos en el estrato lacunoso molecular y radiado son de tipo simétrico. Las interneuronas L-M inhiben también a las células granulares de la fascia dentada y a las interneuronas del estrato molecular (Lacaille et al., 1989).

El conocimiento que se tiene respecto al circuito local de la región CA1 se resume en la Figura No. 8 (Lacaille et al., 1989).

Dado que los procesos de las interneuronas L-M penetran en la fascia dentada, una célula granular y parte de la fascia dentada se incluyen en la figura. Se muestra 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 (G). Se observa que las fibras aferentes hacen sinápsis excitadoras con las células O/A, P, B y L-M en el estrato lacunoso molecular (sinápsis t, u, v, w respectivamente), radiado (sinápsis g, a, f, l) y oriens (sinápsis m, n, o, p). La mayor eficacia de estas sinápsis 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 aferentes del alveus tienen sinápsis excitadoras sobre las células O/A, B y L-M (sinápsis i, h, r respectivamente). Las aferentes en el estrato molecular de la fascia dentada tienen sinápsis excitadoras con las células G y las interneuronas L-M (sinápsis aa y bb). Las células piramidales tienen sinápsis excitadoras con las interneuronas B y O/A (sinápsis b y c). Las células en cesta tienen sinápsis inhibitoras en el soma de las células piramidales (sinápsis d) y posiblemente con interneuronas O/A e interneuronas L-M (sinápsis e y s). Las interneuronas hacen sinápsis inhibitoras en el soma de las células P y B (sinápsis j y k respectivamente) y posiblemente en interneuronas L-M (sinápsis q). Las interneuronas L-M tienen sinápsis inhibitoras con las dendritas de las células P (sinápsis x), con interneuronas del estrato piramidal (posiblemente

células B, sinápsis y) y posiblemente con interneuronas O/A (sinápsis z). Las interneuronas L-M tienen sinápsis inhibitorias con las células G (sinápsis cc) e interneuronas del GD (Lacaille et al., 1989).

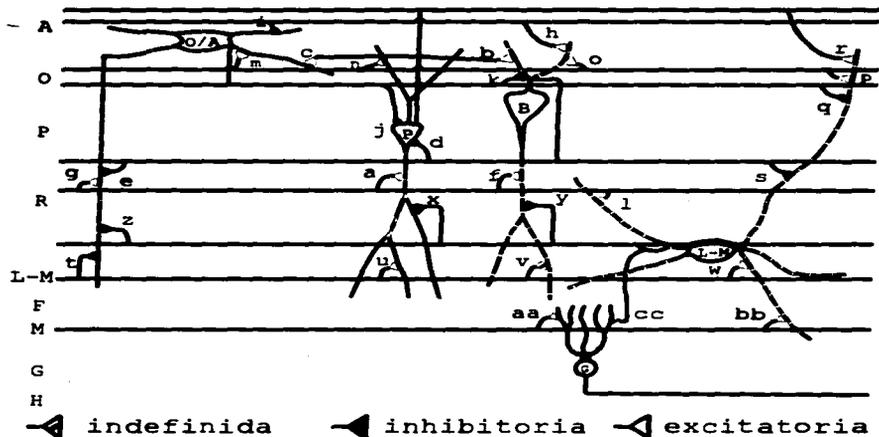
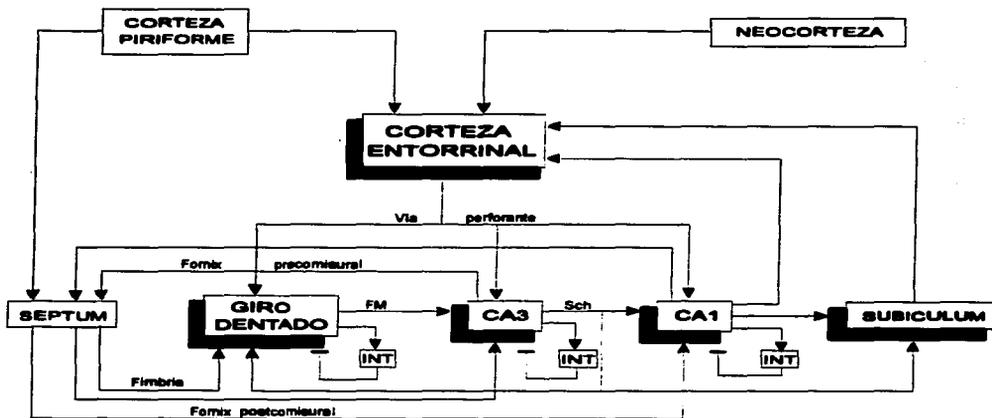


Fig. No. 8 Diagrama que ilustra algunas conexiones del campo CA1 del hipocampo. A= alveus; O= oriens; P= piramidal; R= radiatum; L-M= lacunosomolecular; F= fisura del hipocampo; Giro Dentado= lámina superior; M= molecular; G= lámina granular; H= hilus. Tipos de sinápsis demostradas fisiológicamente: Excitadora (abiertas); Inhibidora (cerradas); Indefinida (rayada), sinápsis demostrada morfológicamente. (Para más detalle ver texto) (Tomada de Lacaille et al., 1989).

El *hilum* tiene un circuito local complejo, con aproximadamente 21 tipos diferentes de interneuronas incluyendo los tipos morfológicamente distinguibles de células en cesta antes mencionadas (Ribak y Seress, 1983; Seress y Ribak, 1983; 1988; Shephred, 1990, González, 1995). Por estudios de inmunohistoquímica se sabe que muchas de las interneuronas son inmunopositivas a GAD, la enzima que cataliza el único paso de síntesis del GABA, el mayor neurotransmisor inhibitorio del SNC de mamíferos; por tal razón, a estas células se les puede considerar GABAérgicas. En el *hilum* el 60% de neuronas polimórficas son positivas a GAD (Seress y Ribak, 1983; González, 1995).

### 1.2.3 Conexiones (aferecias, eferencias y circuito básico):

*Aferentes.* Las principales aferencias hacia el hipocampo y el GD surgen desde la corteza entorrinal (área 28), de la región septal, del cíngulo y del hipocampo contralateral. Las fibras aferentes llegan al hipocampo a través de las vías perforante y alvear que proceden en su mayor parte de la corteza entorrinal y pasan por el subículo y el parasubículo respectivamente (Fig. No. 9). Las fibras de la vía perforante terminan en el estrato lacunoso-molecular y las de la vía alvear en el alveus y en el estrato oriens. Gran parte de las fibras que llegan al estrato lacunoso-molecular provienen de la corteza entorrinal del lado opuesto y alcanzan al hipocampo pasando por la comisura del mismo; las fibras que terminan en el alveus y en el estrato oriens proceden del área entorrinal del mismo lado. Algunas fibras del patrón perforante entran al estrato molecular del giro dentado directamente desde el subículo, mientras que otras viajan primero hacia el estrato lacunoso-molecular del CA1 y CA3. Del área septal los impulsos son conducidos por el fornix. Desde la corteza del cíngulo las fibras cursan por el fascículo homónimo y llegan al asta de Ammon y en gran parte al subiculum. Las fibras que proceden del hipocampo contralateral pasan a la fimbria y después cruzan la línea media por la comisura o fisura del hipocampo (Simonsen, 1973; Steward et al., 1976; Wyss, Swanson y Cowan, 1979; López Antunez, 1979; Galindo, 1991; Bravo, 1991; Parra, 1995; González, 1995). También hay aferencias importantes pero con proyecciones menos numerosas desde algunas otras regiones, incluyendo el hipotálamo, el tálamo y la amígdala (Galindo, 1991; González, 1995).



**Fig. No. 9.** Diagrama de bloques que muestra las principales conexiones del hipocampo. Resaltan las estructuras involucradas en el circuito trisináptico. FM = fibras musgosas; INT = Interneurona; Sch = colaterales de Schaffer (Tomada de García Ruíz, 1994).

**Eferentes.** El hipocampo descarga sus impulsos a través del fómix, que está formado por los axones mielinizados de las células piramidales y en pequeña proporción por los de las células situadas en la fascia dentada (Fig. No. 9). Las fibras pasan primero a la fimbria localizada 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 comisuras posteriores del fómix, un pequeño número cruza en la comisura hipocámpica y otras alcanzan la superficie dorsal del cuerpo caloso donde se incorporan a las estrias mediales y laterales y forman el fómix dorsal. Gran parte de estas últimas fibras pasan a través del cuerpo

calloso para unirse al fórnix principal (Simonsen, 1973; Lauberg, 1979; Wyllie, 1993). A nivel del foramen interventricular se originan las columnas anteriores del fórnix que descienden divergiendo para perderse paulatinamente en las paredes laterales del tercer ventrículo (Nauta, 1958; Simonsen, 1973; Lauberg, 1979). Las columnas posteriores del fórnix (crura fornicis), contornean la parte posterior del tálamo y se unen bajo el cuerpo calloso para formar el cuerpo del fórnix. Al aproximarse a la comisura anterior, las fibras del fórnix se separan en un componente precomisural y otro poscomisural. 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 (componente precomisural), a las áreas hipotalámicas ventral y lateral, núcleo anterior del tálamo y núcleos del cuerpo mamilar (componente postcomisural). 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; Nauta y Feirtag, 1987).

El circuito interno primario o circuito trisináptico está formado por una vía monosináptica excitadora (**vía perforante**) que va de la corteza entorrinal a las células granulares del GD (primera sinápsis); estas células además forman un circuito de inhibición recurrente con las interneuronas inhibitorias (Bravo, 1991; Morgane et al., 1993; González, 1995). Las **fibras musgosas** que provienen de las células granulares del GD son una referencia importante hacia la región CA3 del hipocampo, en donde forman sinápsis excitadoras con las dendritas proximales de las células piramidales (segunda sinápsis). La tercera vía excitadora polisináptica del hipocampo son las **colaterales de Schaffer** de las células piramidales del CA3 que terminan en las dendritas apicales de las células piramidales del CA1 cuyos axones proyectan hacia el subiculum y la corteza entorrinal (tercera sinápsis) (Seress y Ribak, 1983; 1988; Kosaka et al., 1984; Shephred, 1990; Ammassari-Teule et al., 1991; González, 1995) (Fig. No. 9).

Las células piramidales del CA3 proyectan colaterales excitadoras hacia el septum lateral y hacia el hipocampo contralateral y colaterales intrínsecas hacia partes más septales o laterales del CA3.

**Un sistema comisural e ipsilateral formado por las proyecciones de las células del hilio (CA4) llegan hacia el primer tercio interno de la capa molecular dentada contralateral e ipsilateral (Otterser y Storm-Mathisen, 1989).**

#### **1.2.4 Neuroquímica, neurotransmisores y neuromoduladores**

**En el hipocampo se ha encontrado un gran número de neurotransmisores y neuromoduladores. El GABA, es el principal neurotransmisor inhibitorio y los neuromoduladores como la noradrenalina (NA) y la acetilcolina (Ach) se distribuyen de un modo amplio (Shephred, 1990; González, 1995). Se han implicado al Glu principalmente y al Asp como transmisores excitatorios en el hipocampo (Nadler et al., 1976, 1978).**

**La actividad del circuito interno de la formación hipocámpica está bajo la modulación de neuronas inhibitorias locales y de proyección, en su mayor parte a través de fibras GABAérgicas y colinérgicas desde el septo medio, por fibras monoaminérgicas desde el rafe medio y vías noradrenérgicas desde el locus coeruleus. Existen proyecciones de neuronas colinérgicas desde el área del septo medio que hacen sinápsis con las interneuronas del GD, y de las cuales se sabe son el mayor modulador de la actividad theta hipocámpica. Este complejo interneuronal junto con la actividad celular de modulación de monoaminas, es un factor integral en el mecanismo por el que la formación hipocámpica puede recibir y procesar estímulos (Morgane, et al., 1993; González, 1995).**

**El GABA es el aminoácido inhibitorio más importante en el hipocampo. Esta función ha sido descrita tradicionalmente para las células en cesta, pero también se ha descrito en sinápsis axo-axónicas, axo-somáticas y axo-dendríticas lo cual es probable que controle la salida de las neuronas piramidales en virtud de su densa inervación en los segmentos iniciales del axón (Andersen, et al., 1966; Curtis et al., 1971; Galindo, 1991). El GABA en el hipocampo se encuentra principalmente en las regiones CA1, CA2, CA3 y en el GD, mientras que la GAD sólo se encuentra en la capa de las células piramidales de CA3 (Störm-Mathisen, 1978; Galindo, 1991). Es interesante que las neuronas que**

contienen al GABA representan sólo un sistema local, ya que no se ha demostrado que el GABA en el hipocampo provenga de alguna de sus aferencias (Waalas, 1983; Galindo, 1991). En el hipocampo el GABA liberado por las interneuronas inhibitoras actúa sobre el soma y dendritas de las neuronas piramidales y granulares donde puede ejercer su acción sobre los dos principales grupos de receptores que reconocen al GABA, los tipos A ( $GABA_A$ ) y los tipos B ( $GABA_B$ ). En relación con los receptores  $GABA_A$  se ha demostrado que cuando el GABA interactúa con ellos, se acumulan iones con carga negativa en la cara interna de la membrana neuronal. Este fenómeno se debe a que dicho receptor está acoplado a un canal que permite el paso de iones  $Cl^-$  hacia el interior de las células. Debido a que los iones  $Cl^-$  se encuentran mucho más concentrados en el medio extracelular que en el intracelular, una vez que se abren los canales que están acoplados a este receptor se desencadena la entrada de  $Cl^-$  y las neuronas se hiperpolarizan. Se sabe que el receptor  $GABA_A$  es sensible a bicuculina y es el responsable de los PPSI "rápidos" (Newberry y Nicoll, 1984; Bravo, 1991; García Ugalde y Brailowsky, 1993).

Se conocen dos subtipos del receptor  $GABA_B$ . Uno de ellos reduce el paso de  $Ca^{2+}$  hacia el medio intracelular debido a que inhibe a los canales específicos para este catión. Los canales de  $Ca^{2+}$  que están acoplados a este receptor se encuentran en varios tipos de neuronas como las del ganglio de la raíz dorsal y en las células bipolares de la retina. Este grupo de receptores se localiza subcelularmente en terminales presinápticas de la médula espinal y de la retina, por esta ubicación se ha encontrado que tienen la capacidad de modular la liberación de NTS que es dependiente de  $Ca^{2+}$ . El segundo subtipo de este receptor está acoplado a proteínas G y activa una corriente saliente de  $K^+$  en neuronas de estructuras cerebrales como el hipocampo. Dicho evento dependiente de  $K^+$  da origen a los PPSI tardíos o "lentos" que son bloqueados por el antagonista específico del receptor  $GABA_B$ , el flaclofen. Estos receptores  $GABA_B$  se localizan en la posinápsis de áreas como el hipocampo y la neocorteza, y se encargan de hiperpolarizar a las células nerviosas susceptibles (Newberry y Nicoll, 1984; Galindo, Bravo, López y Solís, 1992; García-Ugalde, et al., 1993; González, 1995).

Aunque la acción del GABA está usualmente asociada con hiperpolarización, un efecto despolarizante ha sido descrito y se puede ver unicamente en las capas dendríticas, es debido a un incremento en la conductancia membranal y sirve para cortocircuitar los potenciales postsinápticos producidos por la entrada excitadora (Otersen y Storm-Mathisen, 1989).

En el hipocampo las neuronas tienen receptores con distribuciones espaciales diferentes, el GABA<sub>A</sub> se encuentra en somas y el GABA<sub>B</sub> en dendritas (Shephred, 1990; González, 1995). En el hipocampo, el GABA puede interactuar con otros NTS o sustancias neuromoduladoras, por ejemplo, se sabe que el Glu aumenta la respuesta de los receptores GABA<sub>A</sub> y que los receptores GABA<sub>B</sub> y la serotonina pueden interactuar por medio de canales de K<sup>+</sup> acoplados a la misma proteína G. Además, los PPSI provocados por los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> pueden ser bloqueados por un análogo de la encefalina, aunque estos efectos pueden ser mediados por interneuronas inhibitorias (Bravo, Solís y Meza, 1987; Shephred, 1990; Solís, Bravo y Galindo, 1991; González, 1995).

El Glu está localizado en la vía perforante y por lo tanto a través de esta vía se puede modificar la actividad neuronal del hipocampo. La aplicación ya sea de Glu o Asp "in vivo" o "in vitro" provoca una despolarización neuronal por lo que se observa excitación de una gran población neuronal (Meza, Bravo y Solís, 1986; Frank, et al., 1989; Solís, et al., 1991; Wyllie, 1993).

Se ha involucrado a los tres tipos de receptores para Glu en el hipocampo. El receptor NMDA se encuentra preferentemente en el estrato radiado y en el estrato oriens particularmente en el CA1, los receptores para ácido kaínico se encuentran concentrados en la zona de las fibras musgosas. Los sitios para quisquilato tienen una distribución parecida a los NMDA (Cotman et al., 1987).

Estudios electrofisiológicos sugieren que la transmisión sináptica excitadora rápida involucra principalmente a receptores para quisquilato y ácido kaínico (Ganón, et al., 1986) y que los receptores para NMDA están involucrados en los eventos moduladores lentos tales como la potenciación a largo plazo y que median una menor parte de los PPSE monosinápticos en CA1. Estas vías excitadoras pueden contener otras sustancias neuroactivas. Las fibras musgosas tienen

**Glu o Asp como transmisor y células que se encuentran junto a estas células musgosas contienen GAD que indica la presencia del neurotransmisor inhibitorio GABA 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. La colecistocinina se encuentra en el sistema comisural dentado en el ratón. La vía perforante lateral y medial contienen encefalinas y colecistocinina respectivamente (Fredens, et al., 1984). En la zona de las fibras musgosas se han encontrado encefalinas, dinorfinas y colecistocinina, pero no se ha podido determinar si estos coexisten con el Glu o el Asp o se encuentran en fibras separadas (Otterser y Storm-Mathisen, 1989).**

**En el hipocampo la acetilcolina (Ach) ejerce efectos neuromoduladores sobre las células piramidales en lugares distales al soma. El 50% del suministro colinérgico hacia el hipocampo se origina primariamente en el septo medio y en la banda diagonal de Broca (Shephred, 1990).**

**Las proyecciones noradrenérgicas hacia el hipocampo provienen del locus coeruleus. La densidad de estos suministros hacia el hipocampo difieren en sus diferentes regiones, de tal manera que son más densos en el hilio del GD y en el *stratum lucidum* de la región CA3 y menos densos en el *stratum radiatum* de la región CA1. Probablemente a causa de la distribución diferencial de estos suministros norepinefrínicos se ha encontrado que el sistema noradrenérgico ejerce efectos inhibitorios por separado sobre las diferentes regiones del hipocampo. La norepinefrina (NE) aplicada a la región CA1 puede disminuir la inhibición de las células piramidales de manera directa o bien puede disminuirla a través de las interneuronas inhibitorias (Shephred, 1990; Solís, et al., 1991).**

**El hipocampo se encarga de construir la salida final de los analizadores sensoriales de la neocorteza. El 95% de las células piramidales del área CA3 se han descrito en su totalidad como multimodales, respondiendo a casi cualquier combinación de modalidades sensoriales, y también son descritas como "conscientes de novedad"; esto significa que tienden a mostrar habituación a un estímulo si**

es presentado en forma repetida, y responden más fácilmente a cosas que son nuevas; esto en si mismo representa un tipo de proceso de memoria (De Felipe, et al., 1988; Frank, Schwartzkroin y Phillips, 1989).

### 1.2.5 Inhibición recurrente en el hipocampo

Es bien sabido que las neuronas excitadoras e inhibitoras participan conjuntamente en el procesamiento de información dentro del SNC, de tal forma que el equilibrio excitación-inhibición modula la excitabilidad del tejido nervioso (Solís, Bravo y Galindo, 1991). Por estudios inmunocitoquímicos se ha observado que la presencia de terminales sinápticas GABAérgicas en varias estructuras del SNC (Reynold y Oakley, 1984; Solís, et al., 1991) como el hipocampo es muy significativa, de tal forma que la presencia de esta gran cantidad de terminales inhibitorias, indica que el tejido neural está fuertemente inhibido en su funcionamiento y para que se presentan algunas conductas y funciones, algunos circuitos deben liberarse de la influencia de neuronas inhibitoras, lo que determina el **fenómeno de desinhibición**. Las influencias inhibitoras más acentuadas son producidas por los efectos de los neurotransmisores liberados sobre una neurona por otra neurona inhibidora. Las neuronas inhibitoras pueden estar fásicamente activas, su actividad dependerá de la información que reciban en un momento dado, o bien, pueden estar tónicamente activas, es decir, en actividad constante. Algunas neuronas inhibitoras pueden liberar neurotransmisor inhibitor en forma constante y por lo tanto mantener a otra neurona constantemente inhibida. Esta inhibición puede eliminarse si la neurona que estaba inhibida se despolariza directamente o bien si se inhibe a la neurona que ejerce la inhibición (desinhibición) o por una combinación de ambos mecanismos (Dingledine y Gjerstad, 1980; Roberts, 1984; Solís, et al., 1991; Bravo, 1991).

El fenómeno inhibitorio que se observa en neuronas de las áreas CA3 y CA1 del hipocampo cuando se estimulan con baja frecuencia aferencias neurales a esta estructura, es especialmente interesante. En estas regiones hipocámpicas se registran PPSI de larga duración que modifican la conductancia de la membrana a diferentes iones, principalmente aumenta la conductancia al Cl<sup>-</sup> por la liberación

de GABA de las terminales nerviosas de interneuronas inhibitoras. Aunque en varias partes del SNC se han observado estos PPSI, lo que hace particularmente interesante la inhibición que se observa en el hipocampo es su labilidad, por lo que resulta importante valorar sus posibles cambios cuando el SNC sufre de un insulto como puede ser un período de isquemia-anoxia (Solís, López, Galindo y Bravo, 1992; Romero, López y Solís, 1995). Si se estimulan las fibras comisurales de la fimbria con frecuencias de 4 Hz o más, se observa que en lugar de los PPIS aparecen descargas repetidas, si se aumenta la frecuencia de estimulación se desarrolla actividad paroxística que se caracteriza por postdescargas, fluctuaciones amplias del potencial de membrana y desaparición total de la actividad por uno o dos minutos (Kmjevic, 1982; Solís, et al., 1991). Estos cambios en la excitabilidad de las neuronas hipocámpicas pueden explicarse por los mecanismos de estimulación a baja frecuencia, de inhibición recurrente y de inhibición *feedforward* ya que son lo suficientemente efectivos como para bloquear la excitación provocada por la estimulación comisural. Con la estimulación a altas frecuencias disminuye la eficiencia de la inhibición recurrente y probablemente se potencia la función sináptica excitadora (Solís, et al., 1991). La **inhibición recurrente** se presenta cuando una colateral del axón de la neurona hace contacto con una interneurona que a su vez hace sinápsis con la neurona que da origen a la colateral (Park, Lighthall y Kitai, 1980; Garoutte, 1983; Solís, et al., 1991; Gordon, 1991). En el hipocampo la inhibición recurrente es mediada por las células granulares del GD y las interneuronas inhibitoras (Fig. No. 13A) (Solís, et al., 1991; Bravo, 1991; Galindo, 1991; Jaramillo, Bravo, Galindo y Solís, 1991). Se puede valorar mediante el registro del potencial provocado por la aplicación de estímulos pares (Fig. No. 13B) (MacDonal y Barker, 1977; Kamphuis, Wadman, Bruijs y López da Silva, 1986; Stringer, Williamson y Lothman, 1989; Solís, et al., 1991; Jaramillo, et al., 1991; Galindo, 1991 y Bravo, 1991) que mide la relación de la amplitud del potencial provocado por el primer estímulo (C:condicionante) y la amplitud del segundo potencial provocado por el segundo estímulo (T:prueba). El grado de inhibición recurrente se cuantifica mediante el **índice de máxima inhibición (IMI)** que es la razón de la amplitud del potencial neuronal del segundo potencial provocado = PN(T) sobre la amplitud del potencial neuronal del primer potencial provocado = PN(C) (Kapur y Lothman, 1989a; Solís, et al., 1991) (Fig. No. 13C). Los potenciales provocados extracelularmente en la capa granular del giro dentado, provocados por la estimulación de la corteza entorrinal constan de dos componentes que

corresponden a eventos neuronales diferentes pero relacionados entre sí. El primer componente positivo del potencial corresponde a la despolarización del árbol dendrítico de la célula granular, en respuesta al neurotransmisor excitador liberado por las terminales de la vía perforante y el segundo componente corresponde a la descarga sincrónica de la población neuronal (PN) de muchas células granulares en respuesta a la despolarización dendrítica. La amplitud del potencial que implica la despolarización de la población neuronal es proporcional al número de células granulares que se activan por un estímulo dado (Kapur, Stringer y Lothman, 1989b; Solís, et al., 1991). El IMI es normalmente menor que 1 y tomará valores mayores que 1 cuando haya disminución de la inhibición recurrente. La disminución de la inhibición recurrente se explica por un mecanismo de desinhibición debido a la lesión de neuronas inhibitorias (Solís, et al., 1991; Jaramillo, et al., 1991). El método de estímulos pares aplicados a la vía perforante permite analizar los cambios provocados en la excitabilidad del giro dentado. Al modificar el intervalo entre pulso y pulso se pueden obtener tres cambios en la respuesta provocada (Kapur, et al., 1989a y 1989b). El primero refleja la **inhibición neuronal temprana** y dura de 15 a 35 mseg después de aplicar el estímulo condicionante. Se caracteriza por una marcada depresión en la descarga de la célula granular. Este cambio se observa porque al aplicar el segundo pulso (pulso prueba) 20 mseg después del pulso condicionante la respuesta está francamente disminuida. Esta inhibición neuronal temprana es mediada por la interneuronas GABAérgicas y por el mecanismo inhibitorio de *feedforward* o inhibición anterograda positiva (Buzsáki, 1984; Kapur, et al., 1989a y 1989b; Solís, et al., 1991). El segundo cambio se llama **facilitación**, ocurre dentro de los 35 a 200 mseg después de aplicar el estímulo condicionante y se caracteriza por un marcado incremento en la excitabilidad de las células granulares (Racine, et al., 1983; Solís, et al., 1991). El mecanismo para este incremento en la excitabilidad es desconocido. El tercer cambio es la **inhibición tardía** que ocurre 200 a 1000 mseg después de la aplicación del primer pulso y se caracteriza por una marcada depresión de la excitabilidad de la célula granular que al parecer no es mediada por GABA ya que no se bloquea por la administración de bicuculina ni se incrementa por diazepam (Tuff, et al., 1983; Solís, et al., 1991; Galindo, 1991).

La actividad neuronal en forma de espigas o descargas paroxísticas se correlaciona con un aumento en la concentración de  $K^+$  en el medio extracelular. Es probable que también se establezca una

corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que se observa una disminución en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, lo que determina un mecanismo de retroalimentación positivo para que se libere más neurotransmisor y se refuerce la desinhibición. El aumento del  $\text{K}^+$  extracelular probablemente aumenta la excitación y también puede disminuir la eficiencia de la sinápsis inhibitoria y además facilitar el establecimiento de la corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Heinemann, Konnerth, Lourel, Lux y Pumain, 1982; Krnjevic, 1982; Solís, et al., 1991)

Los mecanismos que pueden estar condicionando la desinhibición que se observa por la estimulación iterativa pueden involucrar algún tipo de sensibilización del receptor postsináptico, fatiga en la vía inhibitoria o lesión de las interneuronas que median la inhibición recurrente. Alternativamente involucran el mecanismo que modula la inhibición recurrente y modificarlo ya sea a nivel presináptico o posináptico. A nivel presináptico se sabe que las interneuronas inhibitorias no son capaces de activarse con frecuencias de estimulación mayores que 1 Hz, por lo tanto cuando se desarrolla una descarga paroxística las interneuronas inhibitorias no se activan debido a sus características intrínsecas o por tener una despolarización sostenida por la presencia de altas concentraciones de  $\text{K}^+$  en el medio extracelular. La alteración posináptica puede deberse a un cambio en la sensibilidad del receptor GABAérgico o bien a la inactivación del canal del  $\text{Cl}^-$  involucrado en dicha inhibición. La modulación de la inhibición en el hipocampo puede deberse a una sustancia que disminuye la inhibición y que puede ser la Ach. La Ach favorece la aparición de descargas repetidas, paroxismos, postdescargas y además modifica la amplitud de los potenciales provocados. Asimismo induce una modificación en la sensibilidad neuronal a la Ach después de la estimulación iterativa del hipocampo o de la corteza cerebral. Es bien conocido que este neurotransmisor putativo juega un papel muy importante en la desinhibición que se observa en el hipocampo después de la estimulación iterativa que induce cambios en la excitabilidad neuronal (Solís, et al., 1991).

La destrucción de interneuronas inhibitorias es un cambio morfológico que se observa en el tejido cerebral sometido a la estimulación eléctrica iterativa con el fin de producir epilepsia (Johnson, 1955; Noebels y Prince, 1977; Simmonds, 1978; Sloviter, 1983; Solís, et al., 1991).

Se ha demostrado que la estimulación del giro dentado del hipocampo genera actividad paroxística, trenes de espigas de gran amplitud en forma de postdescarga (Slater, Steizer y Galvan, 1985; Solís, et al., 1991). La amplitud de estas postdescargas depende del número de células granulares que se activan y que por lo general, al estimular con intensidad umbral la corteza entorrinal, se activa toda la capa de células granulares. La potenciación a largo plazo (LTP) es un fenómeno en el que la eficacia sináptica se modifica después de la estimulación eléctrica repetida de algunas vías aferentes dentro del SNC. En particular la estimulación de ciertas aferencias hipocámpicas provoca LTP de los PPSE y un cambio en la excitabilidad neuronal de larga duración. En estudios llevados a cabo (Solís, et al., 1991) se observó disminución en la inhibición recurrente después de 24 hr de estimulación intermitente de la aferencia ipsilateral (corteza entorrinal lateral)(CEL).

## **ANTECEDENTES**

### **Hipocampo e isquemia**

El hipocampo presenta el umbral más bajo para la descarga eléctrica paroxística (convulsiva) que cualquier otra región del hemisferio cerebral. Esta descarga paroxística se difunde a otras regiones del hemisferio a partir del hipocampo. Esta susceptibilidad para la descarga convulsiva que tiene el hipocampo, debe tomarse en cuenta cuando se tratan de interpretar los resultados de su estimulación o de su lesión, ya que posiblemente gran parte de las consecuencias de las mismas, sean el resultado de la propagación de la descarga hipocámpica a otras regiones del cerebro (López Antunez, 1979; Willis, et al., 1981; De Felipe, et al., 1988; Wyllie, 1993).

**Dentro de las alteraciones fisiopatológicas secundarias a la isquemia-anoxia se postula la existencia de un desbalance en una de las funciones básicas del SNC que es la modulación de la excitabilidad por la relación excitación-inhibición (Solís, et al., 1992; Romero, et al., 1995). En el caso de la isquemia se sabe que predomina una neurotransmisión excitatoria probablemente de naturaleza glutamatérgica lo que dada su excitotoxicidad, determina la lesión neuronal. De la misma manera se postula la existencia de muy poca inhibición. Se ha pensado que el mecanismo fisiopatológico final parece ser la falta de regulación en la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula y que da lugar al daño neuronal irreversible y lesión de diversos componentes estructurales de la neurona (Solís, et al., 1992, Romero, et al., 1995).**

**Algunos estudios han abordado el análisis de la actividad eléctrica neuronal asociada con los fenómenos fisiopatológicos atribuibles a la isquemia-anoxia en estructuras cerebrales. En particular la región del hipocampo ha sido una de las estructuras en las que se ha observado una significativa modificación en la actividad neuronal (Buzsáki. 1989).**

**Existen dos tipos de inhibición GABAérgica en las células piramidales del hipocampo: el GABA aplicado en el soma inhibe generalmente el disparo de la célula y el GABA aplicado en las dendritas disminuye selectivamente la activación de las sinápsis locales. Ambos tipos de inhibición GABAérgica están asociados con aumento importante de las conductancias (Solís, et al., 1991).**

**Evidencias experimentales (Woodbury, 1980; Ribak, Bradburne y Harris, 1983; Lloyd, Munari, Bossi y Morselli, 1984; Bravo, 1991) sugieren que el sistema GABAérgico es muy lábil y especialmente susceptible a alterarse. Esta última observación es pertinente, ya que muchas epilepsias en humanos son causadas por traumatismos, tumores, angiomas cerebrales, isquemia-anoxia, etc., que muy probablemente lesionan a las neuronas GABAérgicas. Asimismo estas condiciones pueden interferir con el aporte sanguíneo normal a una región en particular. Probablemente, las interneuronas GABAérgicas, tienen una tasa metabólica más alta y por lo tanto son más sensibles a la anoxia o hipoxia. Su función se altera, aún con hipoxia ligera y se pueden presentar desde cambios degenerativos, hasta destrucción celular si la anoxia persiste. La anoxia**

también puede ser el resultado de un aumento en la actividad metabólica (Ribak, Bradburne y Harris, 1982; Lloyd, Munari, Bossi y Morselli, 1984; Ribak, Hunt, Bakay y Oertel, 1986; Bravo, 1991; Solís, et al., 1992; Romero, et al., 1995). Las neuronas piramidales del área CA1 son altamente sensibles (vulnerables) a la anoxia y a la isquemia, por lo que pueden mostrar cambios degenerativos en algunos casos de isquemia cerebral y epilepsia del lóbulo temporal (Willis, et al., 1981; Wyllie, 1993).

Dentro de las alteraciones en la actividad eléctrica neuronal asociadas a la isquemia-anoxia se han identificado modificaciones en la descarga neuronal unitaria en las células de la región CA1 del hipocampo y en menor proporción en la corteza cerebral. Este patrón de disparo de la célula es posible que esté relacionado con un ingreso anormal de  $Ca^{2+}$  al interior de las células del hipocampo y en particular a neuronas inhibitorias que terminan por lesionarse (Solís, et al., 1992, Romero, et al., 1995).

Buzsáki y cols. realizaron un estudio en ratas isquémicas mediante oclusión de los cuatro vasos donde observaron que después de la oclusión de las carótidas se presentó actividad rítmica lenta en el hipocampo con disminución gradual de la amplitud. La actividad espontánea desapareció entre los 15 y 25 segundos. Durante este tiempo el potencial provocado permaneció sin alteración pero comenzó a disminuir gradualmente entre 15 y 20 segundos después de que desapareció el EEG. La falla completa del potencial provocado ocurrió después de 1 minuto. En los animales con electrodo de registro en el estrato radiado de CA1 se pudo predecir la desaparición del potencial provocado por la aparición de la fase reversa del potencial trisináptico provocado por la estimulación de la colateral de Schaffer (Buzsáki, Freund, Bayardo y Somogyi, 1989).

Johansen y cols. sugirieron que la isquemia induce focos hiperactivos excitatorios en las células granulares del dentado por destrucción de las neuronas somatostatínicas hiliares y alteración de la inhibición GABAérgica del giro dentado. Con esto se genera una hiperactividad postisquémica de la región CA1 lo que ocasiona la muerte tardía de células piramidales de CA1 (Johansen, Zimmer y Diemer, 1987).

En un estudio realizado en rebanadas de hipocampo de gerbil sometidos a isquemia transitoria y con el uso de la técnica de registro intracelular en sus modalidades patch clamp y whole-cell en neuronas piramidales de la región CA1, se observó que un buen número de estas neuronas muestran propiedades anormales de membrana después de 1 a 3 días de isquemia (Tsubokawa, Oguro, Robinson, Masuzawa y Kawai, 1995). En presencia del ácido  $\alpha$ -amino-3-hydro-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA) la inclinación de la curva corriente-voltage al relacionar las neuronas isquémicas con las neuronas control, las isquémicas tuvieron un mayor incremento en todos los potenciales. Sin embargo, con respecto a las corrientes inducidas por NMDA, la conductancia de las neuronas isquémicas fue reducida con respecto a los controles, especialmente cuando el potencial se mantuvo negativo (Tsubokawa, et al., 1995). En este estudio se observó que en los registros con la técnica de "whole-cell voltage-clamp", la conductancia de AMPA activada por corrientes fue considerablemente mayor en las neuronas isquémicas que en las control. Las corrientes en ambas, controles e isquémicas tuvieron cuatro niveles de conductancia, en el rango de 3.8 a 19 pS en los controles y de 2.8 a 13 pS en las neuronas isquémicas. En las neuronas isquémicas, las corrientes de NMDA fueron considerablemente reducidas y la inclinación de la relación corriente-voltage fue más baja que en las neuronas control. Estos resultados implican que en un estadio temprano seguido a la isquemia, la corriente entrante de  $Ca^{2+}$  a través de canales NMDA juegan un papel importante en la degeneración neuronal. En estudios previos que realizaron Tsubokawa y cols. (1995) observaron que en rebanadas de hipocampo trabajadas de 1 a 3 días después de la isquemia, no se previno la despolarización irreversible de las neuronas CA1 mediante los antagonistas a receptores NMDA por la estimulación de fibras "entrantes". También observaron que las corrientes posinápticas excitatorias de las neuronas piramidales de CA1 registradas de 1 a 3 días después de la isquemia estuvieron compuestas principalmente por corrientes activadas por receptores no NMDA. Los receptores No-NMDA mediados por corrientes entrantes de  $Ca^{2+}$  a través de canales receptores de Glu han sido reportados en varias áreas del cerebro de la rata (Tsubokawa, et al., 1995).

Aunque la investigación cuantitativa de inmunohistoquímica realizada por Johansen, et al., indica que la GAD positiva de las neuronas GABAérgicas del hipocampo son resistentes a la isquemia

cerebral, es evidente que en el período postisquémico hay muerte neuronal tardía de CA1 que está asociada con la hiperactividad postisquémica de las neuronas de la región CA1 (Suzuki, Yamaguchi, Li, y Klatzo, 1983). Durante la isquemia se ha demostrado que en el hipocampo se incrementa ocho veces la concentración extracelular de Glu y Asp (Benveniste, Drejer, Schousboe, Diemer, 1984). Tal acumulación de transmisor excitador puede sensibilizar las células piramidales de CA1 tal y como se ha visto después de la potenciación a largo plazo (LTP) lo que ocasiona aumento en la actividad y respuesta al dar el estímulo (Harris, Teyler, 1984).

Por estudios realizados en algunas estructuras cerebrales para conocer la sensibilidad de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas a la isquemia se sabe que las neuronas GABAérgicas del estriado son altamente sensibles a la isquemia y no así las neuronas colinérgicas de la misma región que resultaron más resistentes. En contraste, las neuronas GABAérgicas del hipocampo representadas principalmente por las células en cesta fueron resistentes a la isquemia (Johansen, Jorgensen y Diemer, 1983; Pulsinelli, 1985).

Sin embargo otra propiedad relacionada con el NT, es el efecto llamado de la cantidad de NT excitador recibido por neuronas sensibles que puede ser un factor importante para determinar la susceptibilidad de tales neuronas a la isquemia (Francis y Pulsinelli, 1982). Al involucrar a las conexiones excitadoras con el daño isquémico se apoya lo probado por los hallazgos en los que al remover la cantidad de Glu que recibe el hipocampo se protege a las células piramidales del daño isquémico, siempre y cuando la denervación se lleve a cabo después del insulto isquémico (Johansen, et al., 1986). En experimentos llevados a cabo, en los que se realizó quirúrgicamente la deaferentación del hipocampo, se observó que las células piramidales de la región CA1 del hipocampo deaferentado fueron protegidas del daño isquémico mientras que las células piramidales de CA1 del hipocampo intacto fueron dañadas irreversiblemente. Estos datos sugieren que la cantidad recibida de NT puede ser un determinante importante del daño isquémico selectivo, y que muy probablemente estén relacionados con Glu u otros aminoácidos excitatorios estimulados por el flujo entrante del ion  $Ca^{2+}$  dentro de las células posinápticas (Pulsinelli, 1985).

Las observaciones morfológicas realizadas en el período inmediato (7 a 24 hr), mediato (1 a 5 días) y tardío (un año) de reperusión, de algunas regiones del hipocampo de gatos sometidos a isquemia global temporal mediante el pinzamiento de las arterias innominada y subclavia izquierda incluyeron la destrucción neuronal de la región hiliar. Los hallazgos encontrados durante el periodo de sobrevida de 1 a 5 días en la región CA3 fueron diversos, ya que había neuronas hiper cromáticas y neuronas con lesión isquémica total. La banda de las fibras musgosas apareció vacuolada; casi todas las células piramidales estaban con cambios celulares homogéneos. Las neuronas del estrato oriens tenían tinción adecuada del núcleo y del nucleolo pero la sustancia de Nissl estaba dispersa en el citoplasma; también se observó respuesta astrogliar masiva. Posteriormente hubo pérdida completa de las células piramidales; algunas neuronas persistieron en el estrato oriens y la respuesta glial se intensificó. Los animales que sobrevivieron un año preservaron la banda de las células piramidales en esta región del hipocampo (CA3). En el giro dentado de los animales que sobrevivieron por un día el edema masivo de la región hiliar produjo distorsión de la lámina de las células granulares. Casi todas las neuronas fueron longitudinalmente ensanchadas, otras estuvieron hiper cromáticas y otras en estado de cambios isquémicos celulares. Al segundo día las células granulares mostraron lesión celular isquémica completa. En todos los animales, las células granulares intactas que se detectaron estuvieron dentro del rango del 10 al 50% de la población celular. Después de 3 a 5 días de recirculación normal las células granulares se observaban azarosamente distribuidas o acomodadas en racimo con neuronas *karyorhexic*. En algunas secciones numerosas neuronas situadas entre las células granulares quedaron intactas. La lámina molecular fue variablemente vacuolada pero nunca severamente dañada. Las células astrogliales comenzaron a infiltrar la lámina de las células granulares del lado hiliar. En los animales que sobrevivieron un año, el giro dentado apareció normal y la lámina molecular tuvo una densidad celular adecuada (Schmidt-Kastner, et al., 1990).

En un estudio realizado por Pulsinelli y cols. con ratas sujetas a oclusión de cuatro vasos (carótidas y vertebrales) el daño neuronal lo observaron en las zonas h1, h3-5 y en la región paramediana del hipocampo. De acuerdo con una clasificación arbitraria que hicieron en este estudio observaron lesiones grado 2 (muchas neuronas dañadas) y grado 3 (la mayoría de las neuronas dañadas) en el 40% del hemisferio cerebral en las neuronas de las regiones h1 y paramediana hipocampal

sometidas a 10 minutos de isquemia, mientras que poblaciones neuronales de otras regiones como h3-5 del hipocampo y neocorteza frecuentemente fueron menos dañadas. 20 minutos de isquemia produjeron lesiones grado 2 y 3 en más del 80% del hemisferio en las neuronas h1 y paramediales del hipocampo y en las neuronas neocorticales en las láminas 3, 5 y 6. La prolongación de la isquemia durante 30 minutos incrementó el porcentaje del hemisferio con daño 2 a 3 en neuronas estriales de tamaño mediano en un 35 a 93% (Pulsinelli, et al., 1982b).

En el estriado el número de neuronas de tamaño mediano irreversiblemente dañadas se incrementó entre 6 y 24 horas después de la reperfusión cerebral. En el hipocampo y la neocorteza hubo incremento del número de neuronas dañadas después de 72 horas de reperfusión cerebral. Más sorprendente fue el retardo del daño de la mayoría de las células piramidales de la región CA1 del hipocampo que no mostraron evidencia de daño ni al microscopio de luz ni al electrónico hasta después de 24 horas de reperfusión cerebral (Pulsinelli, et al., 1979a; Pulsinelli et al., 1982a; 1982b; Petito, et al., 1984).

Kirino en 1982 reportó daño similar tardío en las neuronas CA1 del hipocampo que comenzó 2 días después de 5 minutos de isquemia global en el gerbo.

En el estudio realizado por Jorgensen y cols. histológicamente reportan el daño neuronal isquémico de acuerdo con una escala: grado 0 = normal; 1 = pocas neuronas dañadas; 2 = muchas neuronas dañadas y 3 = la mayoría de las neuronas dañadas. Observaron que las regiones más frecuente y seriamente dañadas fueron del hipocampo la zona CA1 y la región paramediana, seguida por el putamen dorsolateral y la lámina de las células de Purkinje del cerebelo. La corteza, el tálamo y la región CA3 del hipocampo fueron las menos frecuentemente afectadas. Los cambios consistieron en homogeneización de los cambios de la célula nerviosa con citoplasma eosinófilo uniforme y núcleos picnóticos y triangulares. En el hipocampo y el cerebelo, estos cambios se acompañaron por vacuolización de los correspondientes campos dendríticos por ejemplo el estrato radiado y el oriens del hipocampo y el estrato molecular del cerebelo. Observaron macrófagos en forma de bastón en las áreas de daño así como los típicos astrocitos mitóticos (Jorgensen y Diemer, 1982).

Johansen y cols. realizaron un estudio con ratas a las que les provocaron isquemia global mediante la oclusión de 4-vasos y observaron que todas las ratas isquémicas tenían pérdida celular piramidal de la región CA1 a los 4 días postisquémica. Algunas de sus ratas también tuvieron menor daño en las células piramidales del CA3. Los macrófagos en forma de bastón fueron vistos especialmente en el estrato radiado de CA1 y en el hilus, pero sólo en los animales isquémicos (Johansen, et al., 1987).

La evidencia de la integridad metabólica y estructural de la barrera hematoencefálica sugiere que puede tener pequeñas interferencias con el transporte normal de  $C_6H_{12}O_6$  y con los mecanismos de fosforilación. Las dos regiones que desarrollaron daño neuronal de moderado a severo (estriado e hipocampo) mostraron un período breve de incremento en la utilización cerebral regional de glucosa (rCGU) comparado con las estructuras adyacentes y después declinación secundaria en rCGU que coincidió con la aparición del daño celular máximo en esas regiones (Pulsinelli, et al., 1982a). La aceleración transitoria del metabolismo en estructuras que sufren daño isquémico puede ser consecuencia de incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Pulsinelli, et al., 1982a). En el hipocampo se ha observado marcada disociación del flujo sanguíneo cerebral regional (rCBF) a la hora de iniciado el período posisquémico en relación con los controles; el rCBF hipocampal fue de 33% con respecto a los controles que tuvieron 96%, y dicho flujo fue cada vez menor en el hipocampo a medida que pasaba el tiempo, el daño morfológico severo de las neuronas hipocampales h1 no fue aparente sino hasta las 24 hr (Pulsinelli, et al., 1982a). Las mediciones de rCBF y del metabolismo rCGU en el modelo de rata con isquemia del cerebro anterior indican que las anomalías postisquémicas de rCBF y rCGU no pueden explicar el ataque retardado y la progresión del daño notado en varias poblaciones neuronales (Pulsinelli et al., 1982a, 1984). Un ascenso tardío del rCBF de los valores controles dichos ocurre solo en dos regiones cerebrales (estriado e hipocampo) que tienen daño neuronal de moderado a severo y que temporalmente se relacionaron con la aparición del daño máximo (Pulsinelli, et al., 1982a).

Las mediciones cerebrales de PCr, ATP y concentraciones de lactato seguidas de la isquemia cerebral transitoria demuestran recuperación casi completa de las reservas energéticas en el estriado

a las 6 hr y recuperación completa de los depósitos energéticos en la zona CA1 del hipocampo en 24 hr (Pulsinelli, et al., 1983; Pulsinelli et al., 1984). Con periodos de sobrevida superiores a 24 hr hay una disminución secundaria en las reservas energéticas en el estriado y en el hipocampo que coinciden con el consecuente daño neuronal máximo en las respectivas áreas neuronales (Pulsinelli, 1985).

Los aminoácidos excitatorios juegan un rol importante en la potenciación del daño neuronal isquémico. El Glu actúa tanto en receptores NMDA como en No-NMDA. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es a través de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por el receptor NMDA. El receptor NMDA tiene dos sitios agonistas de reconocimiento (para glutamato/aspartato y para glicina/D-serina) (Meldrum, 1995). Los antagonistas a receptores NMDA son relativamente inefectivos en la protección del episodio simple más o menos completo de isquemia cerebral en los roedores mantenidos en normotermia (Meldrum, 1995). Alguna protección puede observarse cuando la isquemia es menos severa (por ejemplo en la oclusión de dos vasos) y al pretratar o administrar tempranamente en el período postisquemia. Los antagonistas NMDA también son más efectivos cuando se utilizan bajo hipotermia o en episodios breves de isquemia global relativamente repetitivos en corto tiempo. Esto ha sido consistente cuando se ha visto la activación de los receptores NMDA durante la despolarización anóxica en donde no es significativa la distribución iónica. En contraste, el deterioro de la energía metabólica y la despolarización parcial pueden incrementar significativamente el efecto excitotóxico de la activación de los receptores NMDA. Este fenómeno ha sido demostrado en las preparaciones "in vitro" usando venenos metabólicos (Meldrum, 1995). Una reducción en el volumen de infarto cortical visto entre 1 y 7 días después de la oclusión transitoria o permanente de la ACM en ratones y ratas puede producirse por la administración de antagonistas de receptores a Glu directamente después de la oclusión de la ACM. Los antagonistas a receptores NMDA de todos los tipos parecen ser igualmente efectivos (i.e antagonistas competitivos tales como el D-CPPene, antagonistas no competitivos tales como el dizocilpine, antagonistas a sitios de glicina tales como el L687, 414 y L689, 560 y antagonistas a sitios de poliamina tales como el ifenprodil y eliprodil). Los antagonistas AMPA de ambos tipos también disminuyen el volumen de infarto cortical. Todos los antagonistas a Glu parecen tener una ventana terapéutica comparable, excepto

que tienen penetración más lenta en el cerebro (por ejemplo D-CPPene) naturalmente acorta el tiempo de ventana. Las pruebas clínicas han iniciado con los antagonistas competitivos NMDA (CGS 19755) para los antagonistas no competitivos (CNS 1102, Cerestat) y para los sitios antagonistas a poliaminas (eliprodil) que muestran marcada baja incidencia o efectos colaterales conocidos y pueden poseer mecanismos de acción en adición con los antagonistas a los receptores NMDA tales como los bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$  (Meldrum, 1995). Los agentes tales como el MK801 y el dextrometorfan producen bloqueo no competitivo con el canal iónico del NMDA. Mientras que los antagonistas NMDA no competitivos han sido estudiados extensamente, los antagonistas competitivos NMDA han sido menos estudiados en los modelos focales de isquemia cerebral porque tienen poca penetración a través de la barrera hematoencefálica o relativamente poca potencia. Un antagonista competitivo NMDA como es el D-CPPene ha tenido efectos neuroprotectores en un modelo de isquemia cerebral focal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) en la rata. Los animales tratados con una dosis de D-CPPene 15 minutos antes de la oclusión de la ACM y seguidos por una infusión constante de dicha droga, mostraron una reducción dosis dependiente en el volumen del infarto en el hemisferio cerebral y la reducción más marcada se observó con la dosis de 4.5 mg/kg + 3 mg/kg/hr. El antagonista NMDA no competitivo MK-801 actúa en el canal iónico de manera uso-dependiente y el resultado del bloqueo NMDA es una marcada mejoría dada la alta concentración extracelular del Glu. En contraste el antagonista NMDA competitivo como el D-CPPene directamente antagoniza al receptor NMDA y el resultado del bloqueo puede ser la atenuación por incremento en la concentración de Glu (Kun, McCulloch, Ki y Rak, 1992).

Los estudios con hibridización "in situ" han sugerido disminución relativa en el mRNA para el GluR2 comparado con el GluR1 y el GluR3 en la región CA1 del hipocampo después de la isquemia global. Sin embargo, al parecer, bajo ciertas circunstancias todas las isoformas de los receptores AMPA son "down-regulation" en aproximadamente igual grado. Entre el receptor metabotrópico los niveles de RNA se incrementan para el mGlu2 y el mGlu4, pero disminuye para el mGlu5 (Meldrum, 1995). Los antagonistas a receptores AMPA (i.e NBQX y GYKI 52466) proveen protección parcial en el hipocampo, estriado y la neocorteza con daño inducido por isquemia global

cuando se dan en el período postisquémico. El efecto se ha visto sólo cuando la isquemia llega justo al umbral para dañar particularmente ciertas neuronas; pero puede disminuir la pérdida de las células piramidales de CA1 seguidas de 10 pero no de 20 min de isquemia global. La depresión del metabolismo postisquémico y la estabilización de los gradientes iónicos a través de las membranas neuronales han sido propuestos como los mecanismos terapéuticos de los barbitúricos y la fenitoina respectivamente. El mecanismo protector de la indometacina (y heparina y PGI<sub>2</sub>) fue propuesto para inhibir la síntesis de prostaglandinas que previenen el daño de la pared de los vasos y por lo tanto el empeoramiento de la reperfusión postisquémica Hallenbeck y Furlow, 1979; Jorgensen, et al., 1982). Desde luego, hay otros estudios en donde se ha valorado el efecto protector de diversos fármacos en diferentes tipos de isquemia, por ejemplo, la nimodipida (Cervantes, 1993), la naloxona (Contreras, 1994) y la progesterona (González, 1996) en isquemia-anoxia cerebral global aguda, entre otros.

## **HIPOTESIS**

Los cambios en la excitabilidad neuronal provocados por el período de isquemia-hipoxia se deben a la alteración en el equilibrio excitación-inhibición, probablemente por falta de modulación inhibitoria por lesión de interneuronas que participan en la inhibición recurrente.

## **OBJETIVOS**

### **4.1 General**

**Demostrar que la isquemia-hipoxia afecta los mecanismos de integración neural de las células subyacentes al circuito trisináptico del hipocampo.**

### **4.2 Particulares**

**4.2.1 Demostrar que algunos cambios en la excitabilidad neuronal del hipocampo se deben a la falta de inhibición recurrente y por lo tanto determinan la aparición de un fenómeno de desinhibición en el tejido neural.**

**4.2.2 Demostrar morfométricamente los cambios de densidad celular localizados en las células granulares del giro dentado y en las piramidales del cuerno de Ammon (campos CA1, CA2, CA3 y CA4).**

**4.2.3 Establecer que los cambios en la inhibición recurrente del hipocampo están relacionados con el daño neuronal causado por la isquemia-hipoxia.**

**4.2.4 Correlacionar los cambios electrofisiológicos con los datos morfométricos que presuntamente determinan los fenómenos paroxísticos observados a corto y largo plazo.**

## **MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 Animales**

Se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar (colonia de la Facultad de Medicina de la UNAM) con peso aproximado de  $250 \pm 40$  g. Se mantuvieron en un ambiente con humedad de 45%, temperatura entre 21 y 23 grados centigrados e iluminación de 100 a 125 lux, en un ciclo de luz obscuridad de 12 hr. La alimentación y la ingesta de agua fueron *ad libitum*.

Las ratas fueron divididas en dos grandes grupos de acuerdo con el momento en el que se realizó la isquemia y el registro electrofisiológico.

a) Agudas

b) Recuperadas.

También se incluyó un grupo control con cirugía de isquemia y estereotáxica simulada, con el fin de descartar un posible daño por el paradigma empleado.

### **5.2 Técnica experimental**

#### **5.2.1 Técnica quirúrgica para isquemia focal transitoria**

5.2.1.1 Grupo de ratas agudas. Los animales se anestesiaron con uretano (dosis de 1.25 g/kg de peso por vía intraperitoneal; Sigma). Una vez que llegaron a la anestesia profunda, se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica y se inmovilizaron con bromuro de pancuronio (dosis de 0.04 mg/kg IM; Organon). La ventilación se mantuvo con un ventilador mecánico de presión positiva intermitente. Durante el desarrollo del experimento se monitoreó la frecuencia cardíaca y la temperatura rectal. Se aplicaron dosis suplementarias tanto de uretano como de pancuronio según

fue necesario. Se colocó al animal en posición ventral, se realizó tricotomía de la cara anterior del cuello y se hizo una incisión longitudinal en la línea media del cuello, se llevó a cabo la disección por planos hasta llegar a ambas arterias carótidas comunes las cuales también se disecaron y se ocluyeron con unas pinzas metálicas atraumáticas de acuerdo con una modificación de la técnica de Pulsinelli (1979) durante 5, 10, 15 y 20 min respectivamente (n=5 para cada condición de tiempo de isquemia) (Fig. No. 10) En las ratas agudas control no se realizó la oclusión de las carótidas. Posteriormente se procedió a suturar la región con seda 000 y se reposicionó al animal para continuar con el registro electrofisiológico.

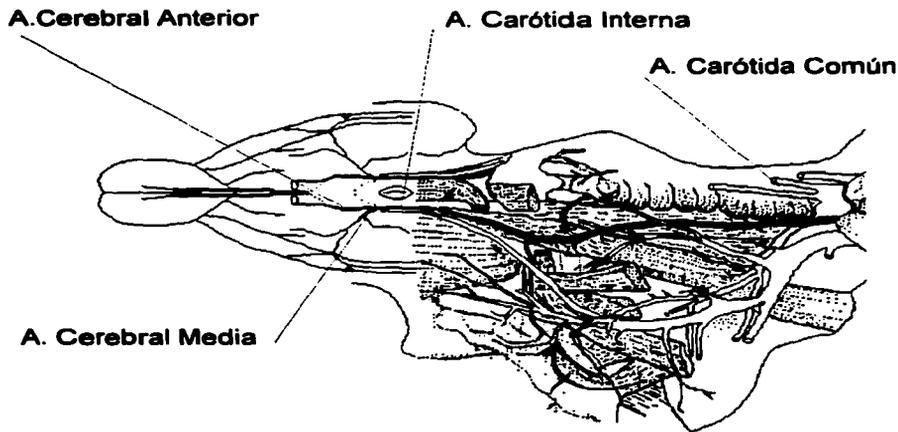


Fig. No. 10 Algunas de las ramas del sistema carotídeo que irrigan la cara ventral del cerebro de la rata. (Modificado de Zeman, et al., 1963 y de Griffith y Farris, 1942).

**5.2.1.2 Grupo de ratas recuperadas.** Previa anestesia con pentobarbital (dosis de 0.02g/kg intraperitoneal; SB), se colocó al animal en posición ventral, se realizó tricotomía de la región y se hizo una incisión longitudinal en la línea media del cuello, se llevó a cabo la disección por planos hasta llegar a ambas arterias carótidas comunes, las cuales también se disecaron y se ocluyeron con unas pinzas metálicas atraumáticas durante 5, 10, 15 y 20 min respectivamente (n=5 para cada condición de tiempo de isquemia). En las ratas recuperadas control no se realizó la oclusión de las carótidas. Una vez que se cumplió el tiempo de isquemia para cada animal, se retiraron las pinzas atraumáticas y se suturó la región con seda 000. Los animales se mantuvieron durante una semana en condiciones normales y el 7o. día se llevó a cabo el registro electrofisiológico

### 5.2.2 Variaciones en el FSC por oclusión de ambas arterias carótidas comunes

Para apreciar los cambios en el FSC se realizó lavado y fijación del cerebro mediante perfusión intracardiaca de solución salina y formol neutro amortiguado. Posteriormente se perfundió solución de tinta china negra al 50% en ambos grupos de ratas (control e isquémico). Al terminar el paso de la solución se removió cada uno de los cerebros y se delimitó la región del hipocampo en sentido coronal del resto del cerebro en un fragmento de aproximadamente 1 cm de espesor. Se continuó la fijación por inmersión durante 24 horas más en formol neutro amortiguado. Posteriormente se hicieron cortes de 400 $\mu$  con estricta seriación mediante el vibraslice. Se realizó deshidratación del tejido en alcoholes de concentración ascendente, se aclaró con resina de creosota y se montó con permount. Una vez seco el medio de montaje se procedió a la toma de fotografías.

### 5.2.3 Registro electrofisiológico

**5.2.3.1 Grupo de ratas agudas.** Con el animal reposicionado en el estereotáxico, se realizó tricotomía de la parte dorsal de la cabeza y se practicó una incisión en la piel. Se separaron los tejidos blandos y se hicieron dos trepanos según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982). El primero a 7.5mm posterior y 4.5 mm lateral izquierdo con respecto a bregma y de 2mm de

diámetro. El segundo a 3.3mm posterior, 2mm lateral izquierdo con respecto a bregma y de 3 a 4mm de diámetro. Se retiró la duramadre y en el primer trepano se colocó un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable con un calibre de 0.4 mm y de 500  $\Omega$  de impedancia que sirvió para estimular la corteza entorrinal lateral izquierda, la profundidad se ajustó de acuerdo a la respuesta provocada en el giro dentado ipsilateral ( $\approx$ 4mm). En el segundo trepano se usó una micropipeta con 5 a 10 M $\Omega$  de impedancia, hecha con un estirador Brown Flaming/Puller, Sutter Instrument Company modelo P-87 y se llenó con una solución de azul de pontamina al 2.5% en KCl 2M. Con un micromanipulador hidráulico David Kopf modelo 12107b, se colocó la pipeta en la región hipocámpica (giro dentado) para obtener los registros de los potenciales provocados de campo (profundidad  $\approx$ 3.5mm) (Fig. No. 11).

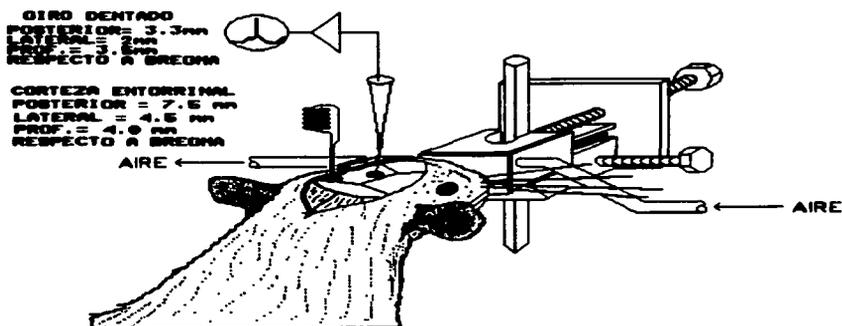
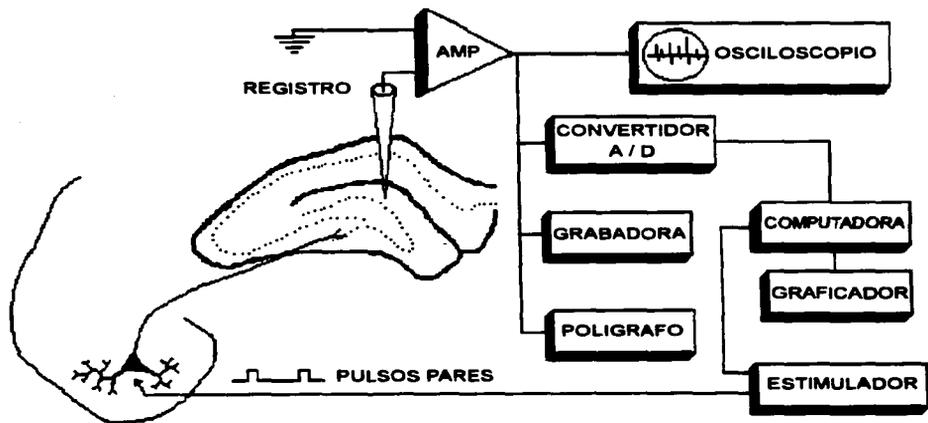


Fig. No. 11 Modelo experimental del animal para el registro y la estimulación electrofisiológica (Tomada de Bravo, 1991 y de Galindo 1991).

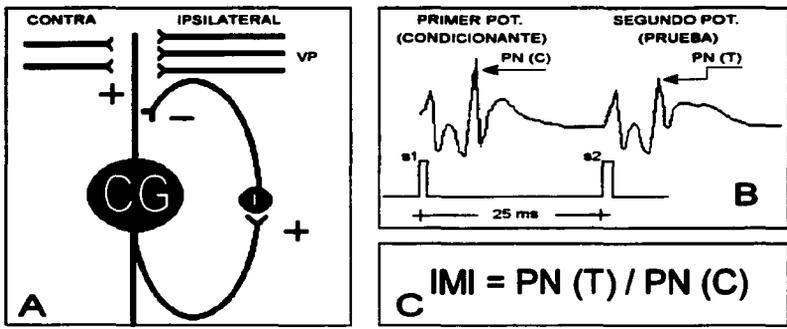
Para observar los cambios en el circuito de inhibición recurrente, se utilizó la técnica de pulsos pares. Este paradigma consiste en la aplicación de un par de pulsos eléctricos a la corteza entorrinal con 25 mseg de intervalo entre pulso y pulso. En este trabajo se mantuvo fijo el intervalo entre pulso y pulso en 25 mseg con el fin de valorar particularmente la inhibición recurrente mediada por GABA (Kapur, et al., 1989a; Solís, et al., 1991). Estos pulsos tienen las mismas características de intensidad y duración (por ésto reciben el nombre de pulsos pares o gemelos). Los potenciales extracelulares de campo (PPES) se registraron en el giro dentado del hipocampo en respuesta al estímulo (pulso monofásico de 0.2 mseg de duración y entre 4 y 8 Volts de intensidad) aplicado a la corteza entorrinal ipsilateral al hipocampo. Los potenciales provocados se amplificaron, se observaron en un osciloscopio Tektronix modelo 5113, se digitalizaron y promediaron mediante un convertidor analógico a digital RC electronics modelo SC18, con una computadora AT 286 (Fig No. 12).



**Fig. No. 12 Diagrama del sistema de registro y análisis de las señales biológicas. (Tomada de Bravo, 1991 y de Galindo, 1991).**

**El grado de inhibición recurrente se cuantificó mediante el índice de máxima inhibición (IMI) que se definió como la razón de la amplitud del potencial neuronal del segundo potencial provocado=PN(T) sobre la amplitud del potencial neuronal del primer potencial provocado=PN(C), donde PN(T) es el potencial prueba y PN(C) es el condicionante (Fig. No. 13). Para valorar las amplitudes de los potenciales provocados se utilizó el programa Grafpot (Bravo, 1990), posteriormente se realizaron los cálculos de la razón de las amplitudes y se obtuvieron los valores del IMI. Es importante mencionar que de cada animal se obtuvieron 15 valores del IMI, mismos que se utilizaron para hacer el análisis estadístico, y que la "n" fue de 5 animales para cada período de isquemia, de tal forma que en total fueron 75 valores del IMI para cada grupo. De dichos valores se obtuvo el promedio, los cuales se analizaron estadísticamente con ANOVA de una vía para determinar las posibles variaciones entre los diferentes grupos y con la prueba de Tukey para discernir que grupos fueron diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ). También se analizaron con ANOVA de dos vías para valorar la influencia y la interacción de las variables. Los cálculos de efectuaron con el programa estadístico SPSS 3.0.**

**5.2.3.2 Grupo de ratas recuperadas.** Después de 7 días de recuperación, los animales se anestesiaron con uretano (dosis de 1.25 g/kg intraperitoneal; Sigma). Una vez anestesiado, se colocó en un aparato de cirugía estereotáxica y se inmovilizó con bromuro de pancuronio (dosis de 0.04 mg/kg intramuscular; Organon). La ventilación se mantuvo con respiración mecánica mediante una bomba de presión positiva intermitente. Durante todo el experimento se monitoreó la frecuencia cardíaca y la temperatura rectal. Se aplicaron dosis suplementarias tanto de uretano como de pancuronio según fue necesario. Se realizó la tricotomía de la parte dorsal de la cabeza y se continuó con el mismo procedimiento descrito anteriormente para el registro electrofisiológico.



**Fig. No. 13 Inhibición recurrente y estímulos pares en el hipocampo. A:** Esquema del circuito inhibitorio que muestra la eferencia proveniente de la corteza entorrinal o vía perforante (VP) ipsi y contralateral. Célula Granulosa (CG); Interneurona inhibitoria (I). **B:** Potenciales provocados de campo y parámetros de los pulsos pares. La amplitud del potencial refleja el número de células granulares que descargan sincrónicamente en respuesta al pulso de estimulación eléctrica. La intensidad de la inhibición se valora por la aplicación de un primer estímulo (s1) seguido de un segundo estímulo (s2) a la vía perforante. El intervalo entre pulsos es el tiempo entre s1 y s2. **C:** La inhibición se cuantificó a través del índice de máxima inhibición (IMI) que se definió como  $PN(T)/PN(C)$ . (Modificada de Bravo, 1991 y de Galindo 1991).

### **5.3 Procedimiento histológico**

Una vez concluido cada uno de los experimentos, se procedió a marcar el sitio de registro mediante el paso de corriente eléctrica de 10  $\mu$ A durante 15 a 20 minutos a través de la pipeta que contiene el azul de pontamina. Posteriormente, con el animal aún anestesiado, se procedió a sacrificarlo mediante perfusión cardíaca de formol neutro amortiguado. Al día siguiente se removió cada uno de los cerebros y se delimitó la región hipocámpica en sentido coronal del resto del cerebro en un fragmento aproximado de 4 mm de espesor. Se continuó la fijación por inmersión durante 24 horas más en formol neutro amortiguado para incluir posteriormente el tejido en paraplast, previa deshidratación en alcoholes de concentración ascendente. El tejido fue seccionado con estricta seriación a 7 $\mu$  de espesor (Fig. No. 14A). De cada porción hipocámpica se obtuvieron de 40 a 50 laminillas con 5 cortes histológicos cada una. Una de cada 5 preparaciones histológicas fue seleccionada para la coloración con las técnicas de Nissl y Klüver-Barrera. Las laminillas seleccionadas siguieron un orden progresivo con el fin de tener representada toda la región hipocámpica y continuar con la metodología morfométrica de manera sistemática.

### **5.4 Análisis morfométrico**

Las observaciones histológicas y de análisis morfométrico de animales controles e isquémicos (agudos y recuperados) se realizó etiquetando las preparaciones con una clave y observándolas al azar con el fin de que las mediciones se hicieran a ciegas y de esta manera evitar sesgos de interpretación.

Para la cuantificación de la densidad neuronal se escogieron un total de 5 cortes separados uno del otro 50 $\mu$  aproximadamente. De cada corte se valoraron el giro dentado (labio dorsal) y los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo (Fig. No.14B). Se empleó el sistema de procesamiento y análisis de imágenes IMAGENA 2000 DE BIOCROM, se obtuvo la densidad celular de cada una de las regiones citadas en un área de 100  $\mu^2$  y en ambos hemisferios.

De los datos obtenidos de la densidad celular se obtuvo el promedio para cada grupo y se analizaron estadísticamente con ANOVA de una vía para determinar las posibles variaciones entre los diferentes grupos y con la prueba de Tukey para discernir que grupos fueron diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ). También se analizaron con ANOVA de dos vías para valorar la influencia y la interacción de las variables. Los cálculos de efectuaron con el programa estadístico SPSS 3.0.

A

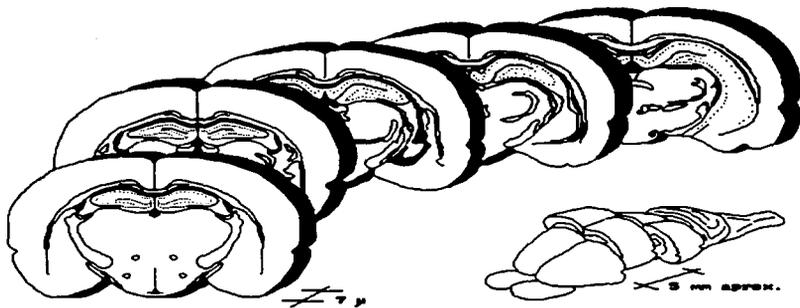
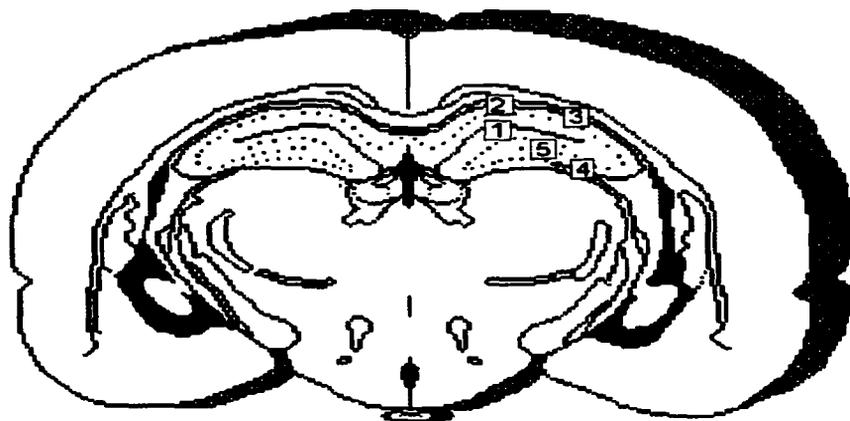


Fig. No. 14 A. Cerebro de rata y niveles de corte analizados.

**B**

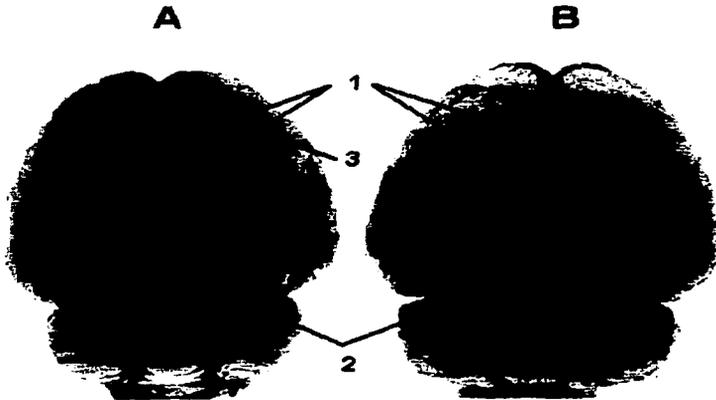


**Fig. No. 14 B.** Corte coronal del cerebro de rata a nivel del hipocampo que muestra las diferentes regiones valoradas. Cada cuadro corresponde a una área de  $100\mu^2$  en el giro dentado (1) y campos CA1 (2), CA2 (3), CA3 (4) y CA4 (5) respectivamente.

## RESULTADOS

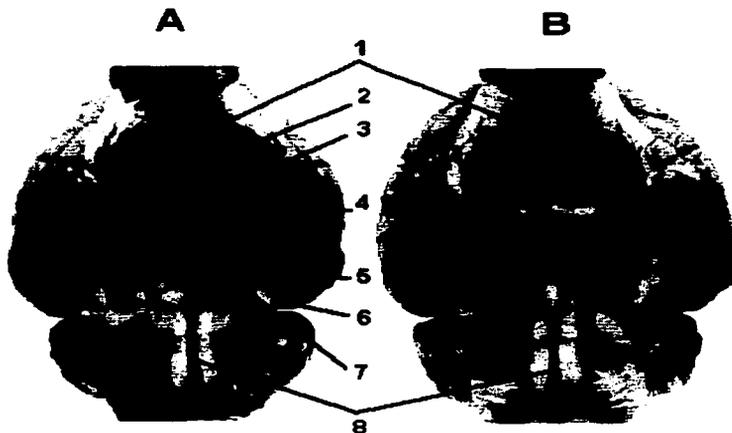
### 6.1 Variaciones en el FSC

En la figura No. 15 se observan las modificaciones macroscópicas de las estructuras vasculares que se presentan en la cara dorsal del cerebro de la rata. El cerebro identificado con la letra A corresponde a la situación control y en el podemos reconocer claramente la continuidad en el trayecto de las estructuras vasculares que se señalan, mientras que el cerebro marcado con la letra B corresponde a la situación de isquemia y en el observamos cierta discontinuidad que en ocasiones hace difícil la identificación del trayecto de los vasos sanguíneos señalados.



**Fig. No. 15** Aspecto dorsal del cerebro de rata en el que se identifican algunas estructuras vasculares (1 Venas cerebrales superiores; 2 Confluencia de los senos; 3 Vena tributaria de la vena cerebral inferior. A situación control; B situación de isquemia) (Griffith, et al., 1942; Zeman, et al., 1963).

La figura No. 16 muestra la cara ventral del cerebro de rata. El cerebro indicado con la letra A corresponde a la situación control y en el observamos el trayecto de las estructuras vasculares que constituyen el círculo arterioso cerebral (círculo de Willis), mientras que, en el cerebro señalado con la letra B, que pertenece a la situación de isquemia, es evidente que dichas estructuras vasculares no se observan con claridad.



**Fig. No. 16** Aspecto ventral del cerebro de rata. Las estructuras señaladas corresponden a: 1 Tronco de la arteria cerebral anterior; 2 Arteria cerebral anterior; 3 Arteria cerebral media; 4 arteria carótida

interna; 5 Arteria comunicante posterior; 6 Arteria cerebral posterior; 7 Arteria cerebelosa superior; 8 Arteria basilar. A situación control; B situación de isquemia (Zeman, et al., 1963).

La figura 17 pertenece a un corte coronal del cerebro de rata en situación control. La trama vascular de las estructuras señaladas se visualiza con facilidad.



Fig. No. 17 Corte coronal de cerebro de rata en situación control. Las estructuras señaladas corresponden a: 1 3er Ventriculo; 2 Corteza fronto-parietal, área motora; 3 CA1; 4 CA2; 5 Corteza fronto-parietal, área somatosensorial; 6 CA3; 7 Giro dentado; 8 Región talámica; 9 Región de la cápsula interna (Paxinos et al., 1982).

La figura 18 corresponde a un corte coronal del cerebro de rata en situación de isquemia. Es evidente la disminución en la trama vascular de las regiones señaladas, con respecto a la situación control (Fig. 17).



Fig. No. 18 Corte coronal de cerebro de rata en situación de isquemia. Las estructuras señaladas corresponden a: 1 3er Ventrículo; 2 Corteza fronto-parietal, área motora; 3 CA1; 4 CA2; 5 Corteza fronto-parietal, área somatosensorial; 6 CA3; 7 Giro dentado; 8 Región talámica; 9 Región de la cápsula interna (Paxinos et al., 1982).

La figura 19 A corresponde a una microfotografía que muestra las regiones de CA1, giro dentado y CA3 del cerebro de rata en la situación control. Se observa claramente la trama vascular de dichas regiones. En B se muestra la situación de isquemia y es evidente la ausencia de trama vascular en las mismas regiones.

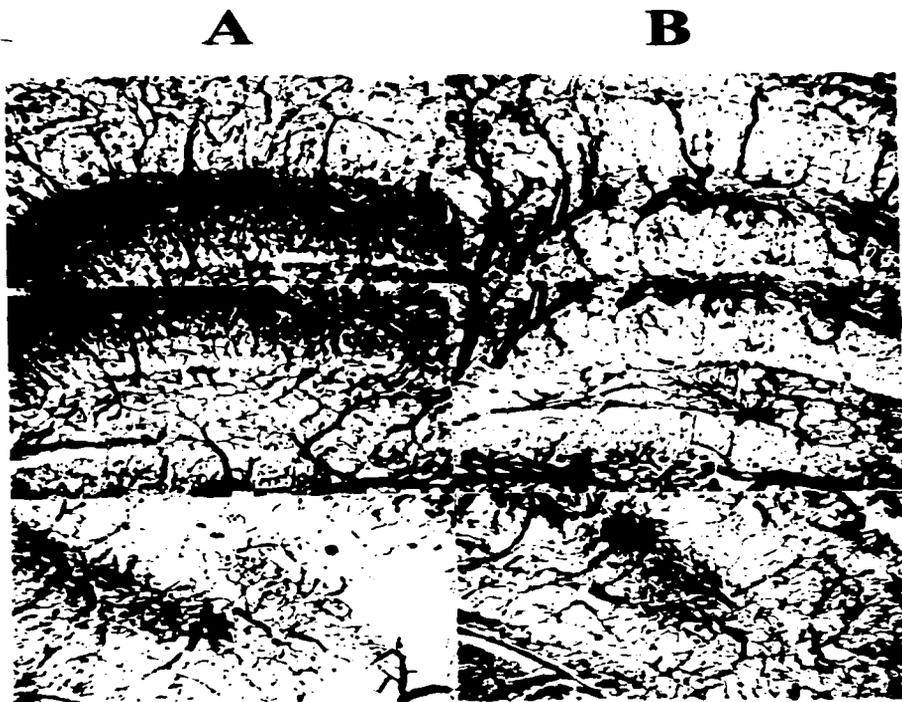


Fig. No. 19 Microfotografía que muestra algunas regiones del hipocampo. A situación control; B situación de isquemia. 1 CA1, 2 giro dentado y 3 CA3.

## 6.2 Electrofisiología

En el análisis estadístico de dos vías (Tabla No. II) se observaron variaciones significativas tanto en la densidad neuronal de las diferentes regiones del hipocampo como en el IMI. Estas variaciones se observaron en los diferentes periodos de tiempo de isquemia (5, 10, 15 y 20 minutos). Sin embargo, no se observó cambio significativo con el tipo de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días). La interacción de tiempo y tipo de isquemia tampoco mostró cambio significativo.

En la figura No. 20 se muestran los valores del IMI en la situación control y en los diferentes tiempos y tipos de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días). En la **isquemia aguda** se puede observar que en el grupo control el valor del IMI es menor que uno ( $\bar{x} = 0.84$ ) y que en los grupos de 10 y 15 minutos el valor promedio del IMI fue de 1.85, este aumento resultó estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control. En el caso de los grupos de 5 y 20 minutos, el valor promedio del IMI fue de 1.4, variación que no resultó estadísticamente significativa. En la **isquemia con recuperación de 7 días** se observó que el grupo de 5 minutos fue el único que mostró aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en el valor del IMI, mientras que los grupos de 10, 15 y 20 minutos que conservaron un valor de IMI  $> 1$  no mostraron significancia estadística.

En la Fig. No. 21 se presentan ejemplos de los potenciales provocados de campo obtenidos con la metodología previamente descrita en los diferentes tiempos de los grupos de isquemia aguda. Nótese la presencia de desinhibición representada por el aumento de la amplitud del segundo componente del segundo potencial de cada par de potenciales que se muestran. En el control la amplitud del segundo componente del segundo potencial es menor que la del segundo componente del primer potencial.

En la Fig. No. 22 también podemos observar la presencia de desinhibición que se refleja en el aumento de la amplitud del segundo componente del segundo potencial de cada par de potenciales que se presentan. En este caso se trata del grupo de isquemia con recuperación de 7 días.

**TABLA No. II Valores de "F" correspondientes a la densidad neuronal y al IMI obtenidos del análisis de varianza de dos factores.**

Parámetro	Grados de libertad	Hipocampo	Tiempo de isquemia	Tipo de isquemia	Interacción
DN/GD	(1,40)	Derecho	5.4****	0.045	0.511
		Izquierdo	6.9****	0.182	0.536
DN/CA1	(1,40)	Derecho	4.1**	0.108	0.212
		Izquierdo	6.0****	0.004	0.539
DN/CA2	(1,40)	Derecho	5.6****	0.287	0.357
		Izquierdo	5.5****	0.041	0.603
DN/CA3	(1,40)	Derecho	7.7****	0.064	0.248
		Izquierdo	3.2*	0.107	0.798
DN/CA4	(1,40)	Derecho	9.1****	0.009	0.127
		Izquierdo	4.7***	0.849	0.839
IMI	(1,40)	Izquierdo	9.4****	0.554	2.12

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

\*\*\*  $p < 0.005$

\*\*\*\*  $p < 0.001$

IMI = índice de máxima inhibición

Tiempo de isquemia = 5, 10, 15 y 20 minutos

Tipo de isquemia = aguda y con recuperación de 7 días.

DN = densidad neuronal

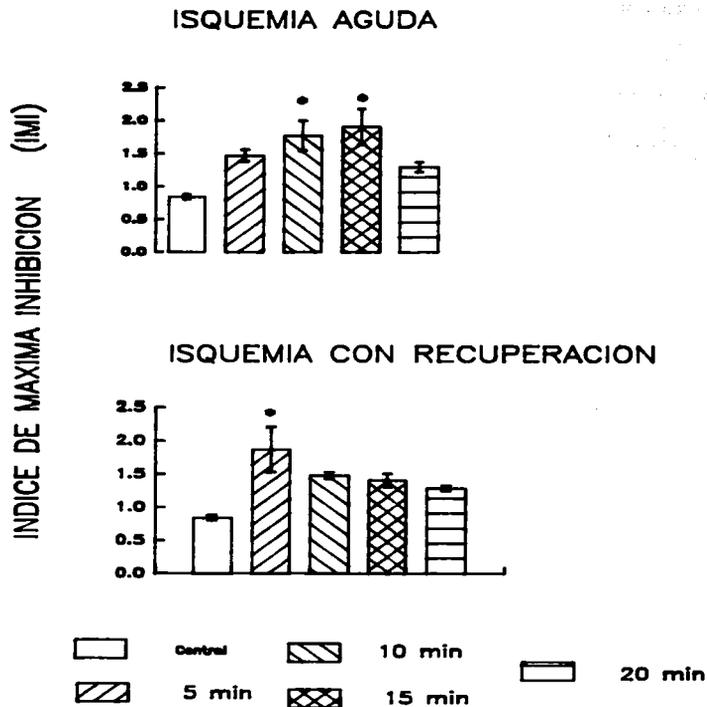
GD = giro dentado

CA1 = cuerno de Ammon 1

CA2 = cuerno de Ammon 2

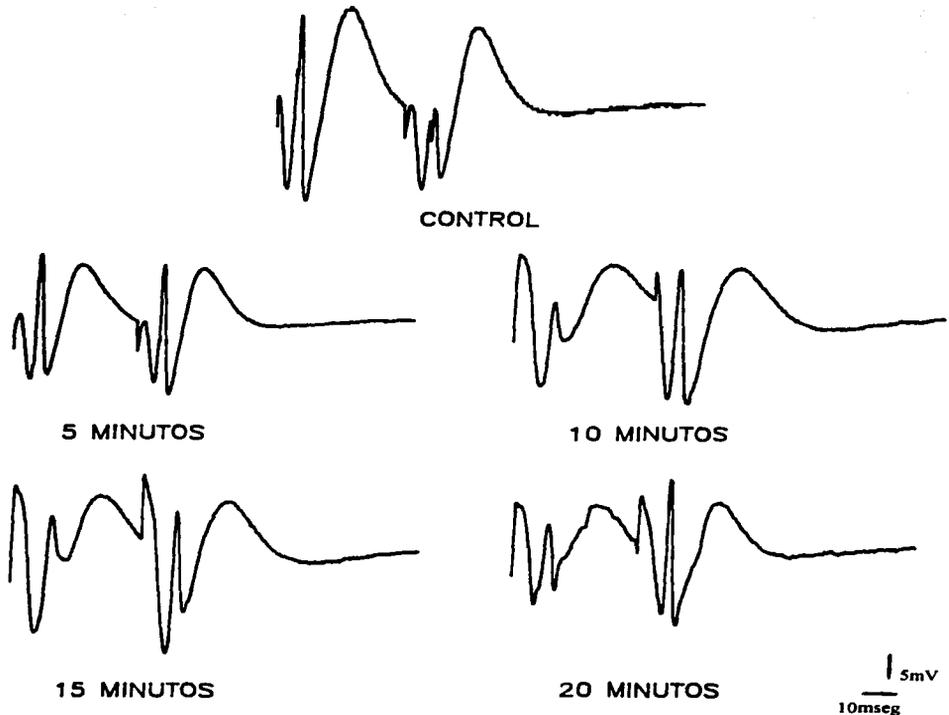
CA3 = cuerno de Ammon 3

CA4 = cuerno de Ammon 4



**Fig. No. 20** Valores del IMI en los dos tipos de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días) y en los diferentes periodos de tiempo para cada grupo de isquemia. (\* =  $p < 0.05$ ).

## ISQUEMIA AGUDA



**Fig. No. 21 Ejemplos de potenciales provocados de campo obtenidos con la metodología descrita en los diferentes periodos de tiempo de isquemia aguda. Nótese el aumento en la amplitud del segundo componente del segundo potencial de cada par de potenciales que se muestran (excepto en el control), lo que refleja falta de inhibición (desinhibición).**

## ISQUEMIA CON RECUPERACION

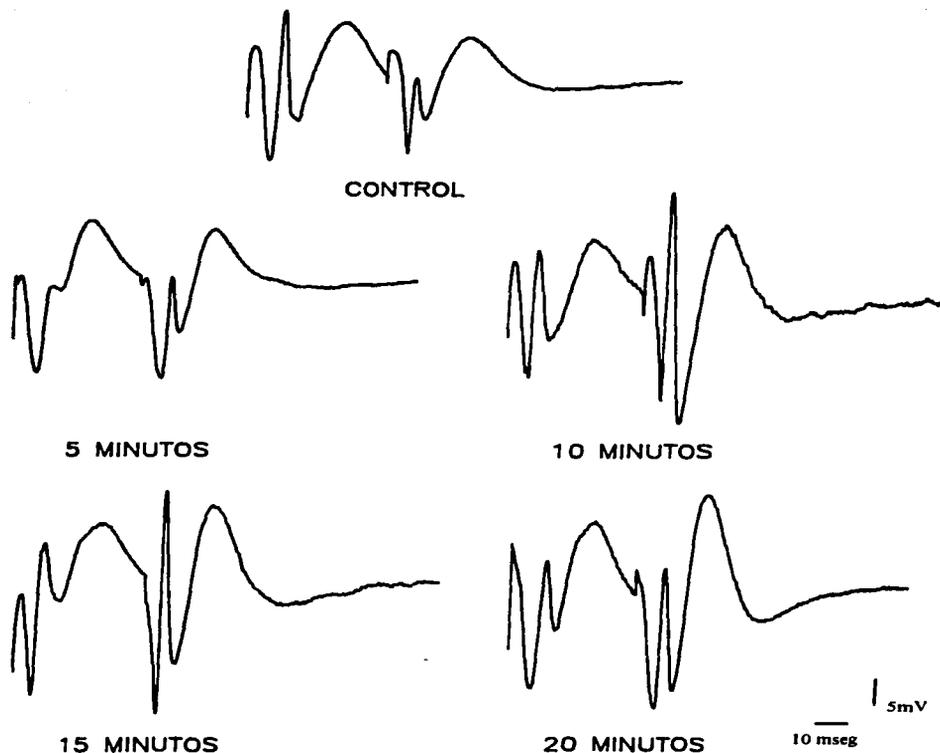


Fig. No. 22 Ejemplos de potenciales provocados de campo obtenidos de los diferentes periodos de tiempo de isquemia con recuperación de 7 días. Nótese la presencia de desinhibición reflejada por el aumento del segundo componente del segundo potencial de cada par de potenciales que se muestran (excepto el control).

### **6.3 Histología**

La valoración de las alteraciones en la densidad neuronal se realizó en las regiones de ambos hipocampos localizadas entre 2.8 y 5.3 mm posteriores a bregma de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982). La zona del hipocampo donde con más frecuencia se observó el área de registro fue en el sitio limitado por las coordenadas antes descritas (Fig. No. 11) y a una profundidad de 3.4 mm.

Se describen los cambios morfológicos en el estrato granular del giro dentado (labio dorsal) y en el estrato piramidal de los campos CA1 (regio superior), CA2, CA3 (regio inferior) y CA4 (hilio) como se muestra en la Fig 14B.

Las pocas neuronas situadas en el estrato oriens y lacunoso molecular se descartaron en este estudio por considerarse de naturaleza funcional diferente a las pertenecientes al estrato piramidal de cada campo.

El estrato granular del giro dentado se observó constituido de células granulares típicas, densamente agrupadas y con tinción homogénea con las técnicas de anilinas mencionadas. Las células pertenecientes al estrato piramidal de las diferentes áreas del hipocampo se encontraron normales con soma grande, núcleo vesiculoso, nucleolos bien definidos y basófilos, citoplasma homogéneo con sustancia de Nissl en típicos grumos (Fig. No. 23).

#### **6.3.1 Histología del hipocampo isquémico**

Debido al tipo de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días) y a los diferentes periodos de tiempo de isquemia, encontramos zonas de alteración neuronal que fueron reconocidas como cambios en la morfología normal y alteraciones en la apetencia tintoria de las mismas, que se reflejaron en diferentes grados de daño celular. Por esta razón decidimos contar sólo aquellas células

que aparentemente estaban íntegras en su morfología para evitar al máximo errores en la interpretación del daño celular.

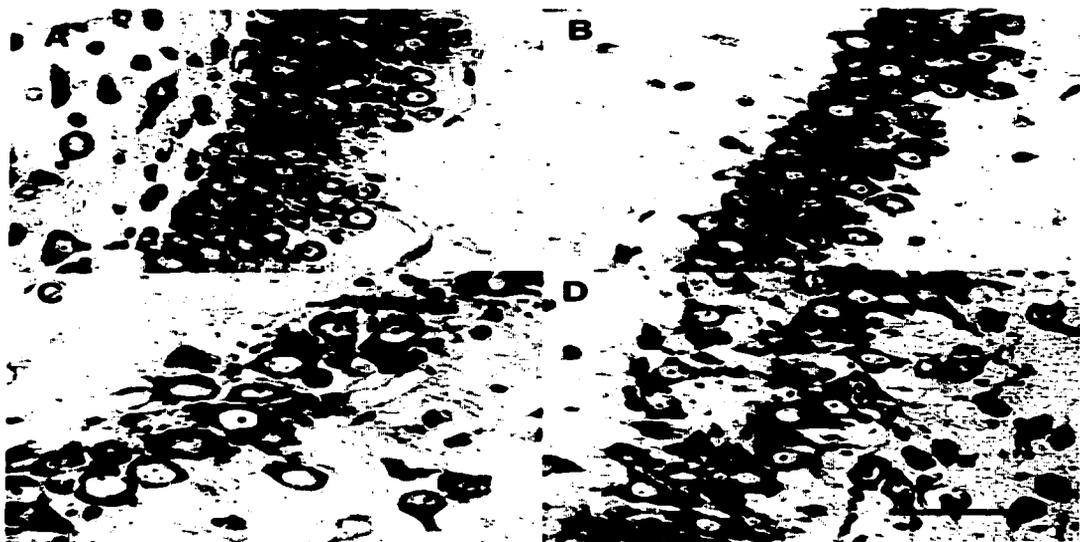


Fig. No. 23 Fotografía de impresión láser de diferentes zonas del hipocampo de animales del grupo control. La morfología típica puede reconocerse en cada una de las neuronas pertenecientes al GD (A), CA1 (B), CA3 (C) y CA4 (D). Barra de calibración = 50µm.

También existe una clara reacción glial generalizada en todo el hipocampo, pero dado que los objetivos de este trabajo no incluyen la valoración de este aspecto, no mencionamos más detalles al respecto.

**6.3.1.1 Isquemia aguda.** Los cortes teñidos con las técnicas de anilinas antes descritas mostraron que las primeras evidencias de alteración celular fueron el aumento gradual en la acidofilia del soma de las células del GD y de las otras áreas del hipocampo. La aparición de pequeñas vacuolas en el citoplasma y la contracción del núcleo o picnosis celular constituyeron índices morfológicos importantes para considerar la alteración celular. En las zonas de daño celular se observaron áreas de necrosis neuronal selectiva (antes descrita) y sólo en pocos individuos pudo reconocerse la necrosis neuronal generalizada. (Fig No. 24).

En la tabla No. II se presentan los valores de "F" del análisis estadístico de dos factores de la densidad neuronal del hipocampo y claramente observamos la variación estadísticamente significativa que mostró cada región del hipocampo de acuerdo con el tiempo de isquemia.

En la tabla No. III se muestran en términos de porcentaje de cambio sólo los resultados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) del análisis con el ANOVA de un factor y la comparación entre los grupos con la prueba de Tukey del efecto de la isquemia en el hipocampo. Observamos que las diferentes regiones presentan un cambio variable con relación al tiempo de isquemia aguda. El GD de ambos hipocampos presentó una disminución promedio del 33% con respecto al control a los 20 minutos de isquemia, mientras que en el CA1 la disminución observada en relación con el control sólo correspondió al hipocampo izquierdo y en el CA3 fue en el hipocampo derecho. Sin embargo en el CA2 no hubo variación estadísticamente significativa, mientras que en el CA4 la disminución respecto al control se observó en los grupos de 10 y 15 minutos y sólo en el hipocampo derecho.

En la figura No. 25 se muestra la densidad neuronal de las diferentes regiones del hipocampo en función de los periodos de tiempo a los que fueron sometidos los animales y se señalan las disminuciones significativas (\*= $p < 0.05$ ) en la densidad neuronal con respecto al control.

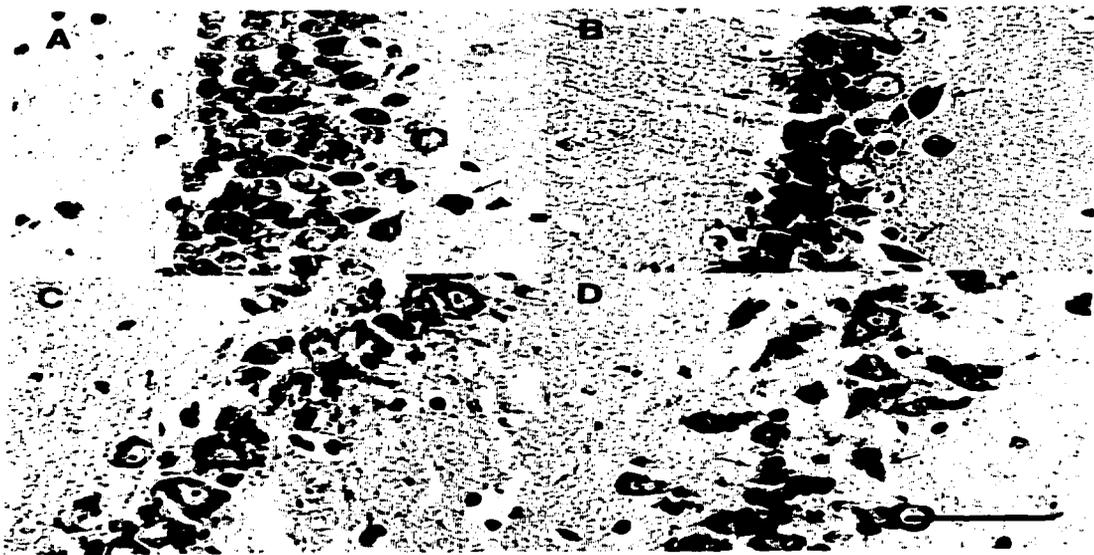


Fig. No. 24 Fotografía de impresión laser de diferentes zonas del hipocampo de animales sometidos a un periodo de 20 minutos de isquemia aguda. Se señalan las células picnóticas ( → ), células hiperocrómicas ( = ) y desarreglo del neuropilo ( \* ). A (GD), B CA1, C (CA3) y D (CA4). Barra de calibración = 50 $\mu$ m.

**TABLA No. III Efecto de los diferentes periodos de isquemia aguda y con recuperación de 7 días sobre la densidad neuronal del hipocampo**

	TIEMPO	Control vs Agudas		Control vs Recuperadas	
		D	I	D	I
GD	5				
	10				
	15				
	20	-30%	-36%		
CA1	5				
	10				
	15				
	20		-31%		-31%
CA2	5				
	10				
	15				
	20				
CA3	5				
	10			-29%	
	15				
	20	-27%			
CA4	5				
	10	-24%			
	15	-28%		-26%	
	20				

Análisis estadístico del efecto de la isquemia en la densidad neuronal del hipocampo (ANOVA de un factor / Prueba de Tukey).

Comparación entre tiempos de isquemia  $p < 0.05$

Sólo se indica el porcentaje de cambio (- =disminución) en caso de existir significancia.

(Tiempo = duración del período de isquemia en minutos; D = Derecho; I = Izquierdo)

## ISQUEMIA AGUDA

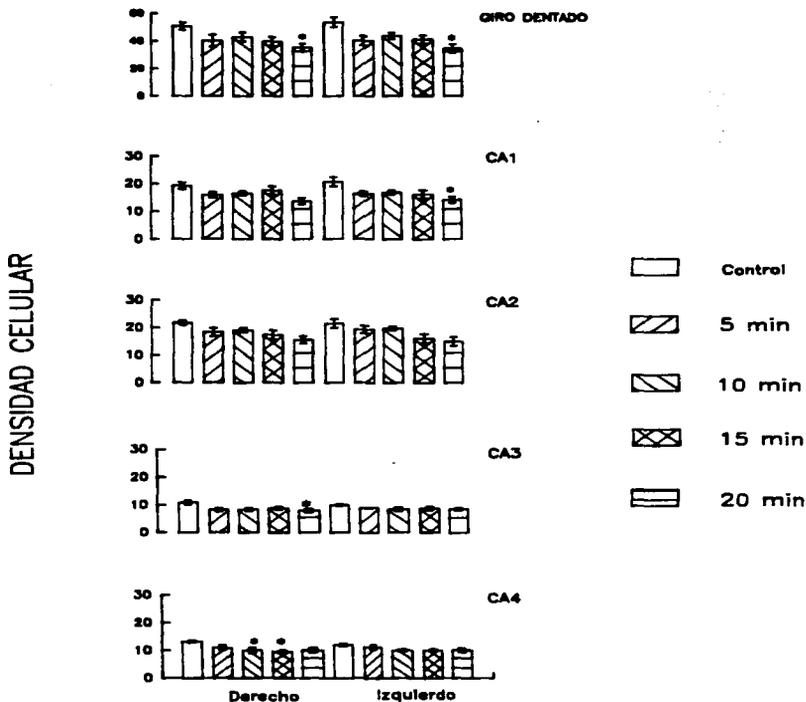


Fig. No. 25 Valores de la densidad neuronal de las diversas regiones de ambos hipocampos (derecho e izquierdo) obtenidos de los diferentes periodos de tiempo del grupo de ischemia aguda.

(\* =  $p < 0.05$  ).

**6.3.1.2 Isquemia con recuperación de 7 días.** Las alteraciones morfológicas encontradas en estos grupos fueron basicamente similares a las descritas en la isquemia aguda. Esto es, aparición de necrosis celular, microvacuolización citoplásmica, aumento en la acidofilia celular, distorsión y picnosis nuclear así como desarreglo discreto del neuropilo. Para todos los estados o tiempos de isquemia fue posible observar neuronas hipercromáticas localizadas cercanas a otras con daño isquémico definitivo (Fig. No. 26).

En la Tabla No. III observamos que la región que mostró disminución en la densidad neuronal con respecto al control fue el CA3 derecho en el grupo de 10 minutos, mientras que en el CA4 derecho fue el grupo de 15 minutos y en el CA1 izquierdo el grupo de 20 minutos.

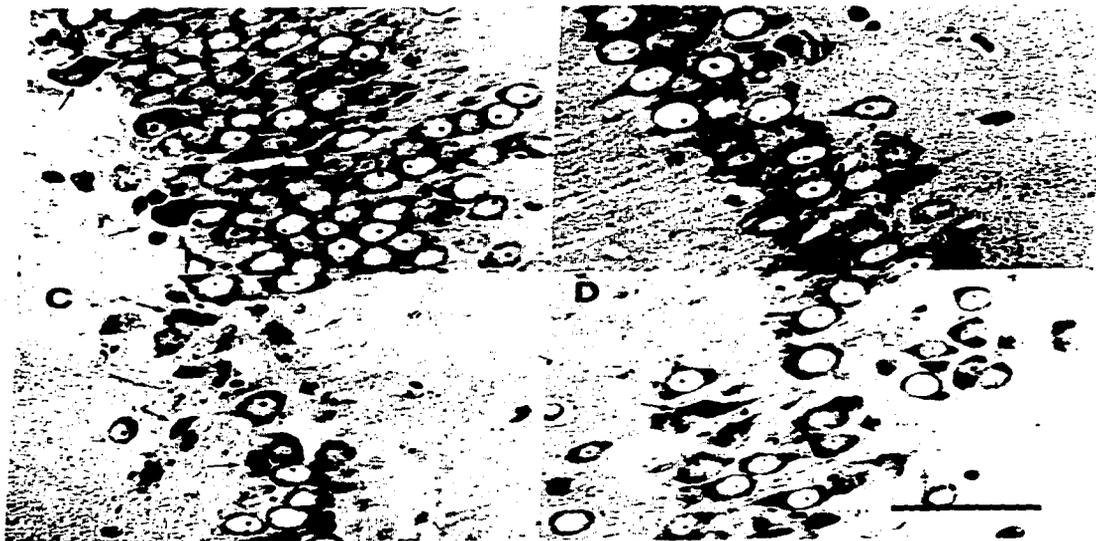
En la Figura No. 27 se muestra la densidad neuronal de las diferentes regiones del hipocampo en función de los periodos de tiempo a los que fueron sometidos los animales con recuperación de 7 días y se señalan las disminuciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la densidad neuronal con respecto al control.

Dado que los cambios observados en la densidad neuronal del GD en ambos tipos de isquemia así como en CA1 no pueden atribuirse al trayecto del electrodo de registro, decidimos utilizar el hipocampo izquierdo para relacionarlo con los datos electrofisiológicos, ya que fue el sitio donde se obtuvo la actividad eléctrica.

#### **6.4 Electrofisiología y Morfometría del giro dentado izquierdo**

En la Tabla No. IV se observa la relación de los datos de la densidad celular del giro dentado izquierdo con los valores del IMI registrados en el mismo sitio. En la situación de **isquemia aguda** se observó una disminución del 18 al 36% en la densidad neuronal en los diferentes periodos de tiempo de isquemia y como se mencionó anteriormente, el único valor que resultó estadísticamente significativo fue el del grupo de 20 minutos. En los grupos de **isquemia con recuperación de 7**

**días** la disminución en la densidad neuronal que se observó fue del 18 al 26% con respecto al control sin significancia estadística en los diferentes periodos de tiempo de ischemia, mientras que el valor del IMI aumentó hasta en un 123% respecto al control en el grupo de 5 minutos, y las variaciones que se observaron fueron del 76, 68 y 54% en los grupos de 10, 15 y 20 minutos respectivamente.



**Fig. No. 26** Fotografía de impresión laser de diferentes regiones del hipocampo de animales sometidos a un período de 20 minutos de ischemia con recuperación de 7 días. Observe la presencia de células con franca picnosis ( → ), otras con alteración en su apetencia tintoria normal ( ⇨ ) además de sensible pérdida neuronal ( \* ). A (GD), B (CA1), C (CA3) y D (CA4). Barra de calibración = 50µm.

## ISQUEMIA CON RECUPERACION

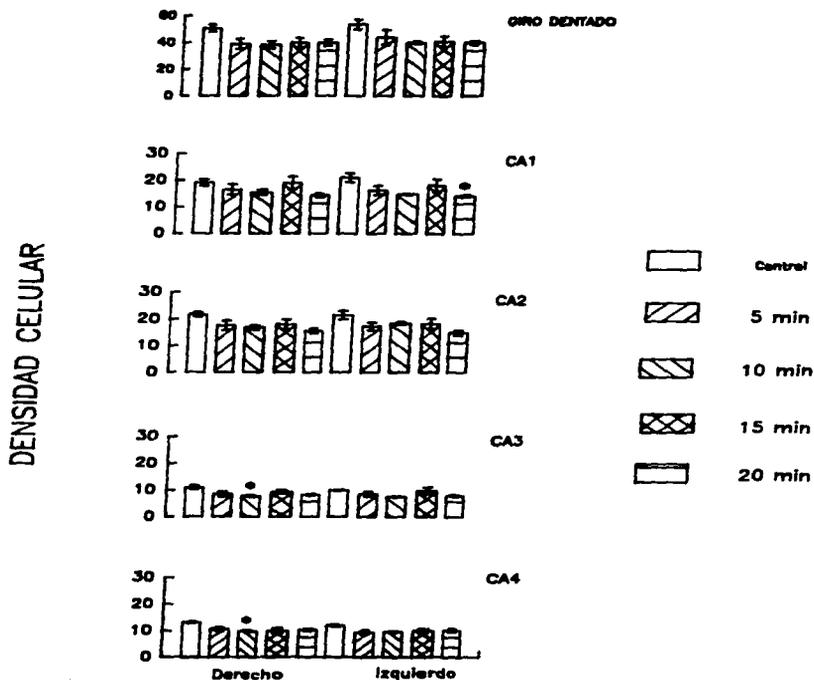


Fig. No. 27 Valores de la densidad neuronal de las diversas regiones de ambos hipocampos (derecho e izquierdo) obtenidos de los diferentes periodos de tiempo del grupo de isquemia con recuperación de 7 días. (\* =  $p < 0.05$ ).

**TABLA No. IV Relación de la densidad neuronal del giro dentado con los valores del IMI.**

Condición	Parámetros	Control		5 minutos		10 minutos		15 minutos		20 minutos	
		VP	%	VP	%	VP	%	VP	%	VP	%
Agudas	IMI	0.84	100	1.5	75	1.8	111*	1.9	126*	1.3	55
	DN	54	100	40	-25	44	-18	41	-23*	35	-36*
Recuperadas.	IMI	0.84	100	1.9	122*	1.5	76*	1.4	68*	1.3	53*
	DN	54	100	44	-18	40	-25*	41	-24*	40	-26*

Comparación entre la Densidad Celular del Giro Dentado Izquierdo con los valores obtenidos de los IMIS de animales con diferentes periodos de isquemia (5, 10, 15 y 20 minutos) aguda y con recuperación de 7 días.

Análisis estadístico del efecto de la isquemia en la densidad neuronal del hipocampo (ANOVA de un factor / Prueba de Tukey).

Comparación entre tiempos de isquemia  $p < 0.05$ , se indica (\*) el porcentaje de cambio (- =disminución) en caso de existir significancia.

(DN = densidad neuronal; IMI = índice de máxima inhibición; VP = valor promedio; % = porcentaje de cambio; \* =  $p < 0.05$ ).

## **DISCUSION**

En este trabajo se realizó un modelo de isquemia focal mediante la oclusión de ambas arterias carótidas comunes con diferentes periodos de tiempo (5, 10, 15 y 20 minutos) aguda y con recuperación de 7 días.

Como sabemos la isquemia focal es incompleta y condiciona un FSC compensador en áreas circunvecinas en forma temprana, que compensa la hipoperfusión general y posteriormente se presenta la recirculación por recanalización de los vasos ocluidos (Raichle, 1979, Kaplan, et al., 1987, Buchan, 1992). La reducción del FSC no es homogénea en el tejido que sufre de isquemia incompleta, ya que frecuentemente se ha observado que el tejido forma un anillo llamado "penumbra isquémica" alrededor del sitio en donde el daño isquémico es más severo y en el cual existen fallas energéticas y de los mecanismos de intercambio iónico (Astrup, et al., 1981; Marcoux, et al., 1982; Torvik, et al., 1986). Además la isquemia incompleta se asocia con acidosis láctica severa a nivel tisular, debido a que el flujo sanguíneo residual continua liberando  $C_6H_{12}O_6$  en un territorio con mecanismo glucolítico anaeróbico (Raichle, 1983; Martínez, 1991; Lutz, et al., 1994). Aunque Steen, Michenfelder y Milde (1979) en un trabajo que realizaron concluyeron que la retención de un FSC mínimo, i.e. menos del 10% del normal, es benéfico para el encefalo isquémico. Casi todas las evidencias reportan que las situaciones antes mencionadas, afectan de manera diversa y gradual a las estructuras nerviosas.

El paradigma empleado en este trabajo simula lo que ocurre más frecuentemente en el ser humano desde el punto de vista clínico (Plum, et al., 1982; Nedergaard, 1988; Lutz, et al., 1994), y es un modelo sustancialmente diferente de los otros modelos experimentales de isquemia global mediante la oclusión de los cuatro vasos (carótidas y vertebrales) (Pulsinelli, et al., 1979) y de isquemia global por paro cardiorrespiratorio (Cervantes, 1993; Pluta, et al., 1979), ya que en estos modelos no hay flujo sanguíneo residual durante la isquemia. En el momento de la reperfusión también hay

diferencias, puesto que en el modelo desarrollado en este trabajo el FSC disminuye un 50% (Eklöf, et al., 1972a; 1972b) y por lo tanto la **reperusión es menos drástica**, mientras que en el modelo de **isquemia global por oclusión de cuatro vasos**, a partir del momento de la oclusión de los cuatro vasos el FSC alcanza valores muy cercanos a cero y la **reperusión es del 50% -al restablecer el flujo carotídeo-** en un tejido sin irrigación previa. En la **isquemia global por paro cardiopulmonario la reperusión es masiva**.

Desde el punto de vista **electrofisiológico** se observó que la respuesta del tejido neural se modificó de manera significativa en varias situaciones de isquemia.

En la **isquemia aguda** el cambio ocurrió principalmente en los grupos de 10 y 15 minutos. En estos grupos el IMI mostró valores significativos que reflejaron aumento en la excitabilidad debido a **desinhibición**. Llama la atención que en los grupos de 5 y 20 minutos la razón del IMI, no obstante de modificarse, no presentó significancia estadística. Es probable que estas diferencias, en particular las del grupo de 20 minutos se deban al grado y tipo de lesión neural que ocurrió. Es decir, que la amplitud del potencial provocado está en relación directa con el número de somas neuronales que se despolarizan. Al parecer, con 5 minutos de isquemia no se altera de manera permanente el grupo de células que responden al estímulo de la corteza entorrinal. Con 20 minutos de isquemia el daño del grupo neural es tan severo que lesiona permanentemente a la célula, de tal forma que no es posible tener la cantidad de células parcialmente alteradas para que respondan e integren la respuesta electrofisiológica.

Con respecto a los grupos de **isquemia con recuperación de 7 días**, se observó que son suficientes 5 minutos, para que se establezca el cambio electrofisiológico estadísticamente significativo que refleja **desinhibición**. Es probable que con los otros tiempos el tejido se dañe más severamente de tal forma que no permite evidenciar estadísticamente la respuesta electrofisiológica integrada que refleja el fenómeno de **desinhibición** probablemente relacionado con lesión de interneuronas inhibitorias (Solís, et al., 1991 ).

Respecto a los **daños morfológicos** encontrados en este trabajo, las diferencias de vulnerabilidad descritas para la región del hipocampo (Pulsinelli, 1985) fueron evidentes, aunque con ciertas diferencias que pueden estar relacionadas con el modelo desarrollado de isquemia focal. La mayor vulnerabilidad que observamos en el grupo de 20 minutos de **isquemia aguda** en el GD, en el campo CA1 y en el CA3 puede estar íntimamente relacionada con las particularidades vasculares de estas regiones, así como con la reducción heterogénea del FSC que sufre el tejido con isquemia incompleta (Astrup, et al., 1981; Marcoux, et al., 1982; Torvik, et al., 1986) de tal modo que la alteración de la región CA4 se observó en el grupo de 10 y 15 minutos mientras que la del CA2 no fue evidente desde el punto de vista estadístico. Es decir, el CA4 requirió de menos tiempo para hacer evidente su disminución en la densidad neuronal, quizá porque el FSC residual en la isquemia focal aguda disminuye progresivamente en las diferentes áreas del hipocampo (Nedergaard, et al., 1984; Torvik, et al., 1986) y además hasta cierto punto coincide con lo dicho por Heiss (1983) y Graham (1992) de que el daño morfológico por isquemia cerebral es dependiente de tiempo. Estos resultados contrastan relativamente con los reportados por otros trabajos (Pulsinelli, 1985) en donde mencionan que el GD es la región menos vulnerable o bien que presenta un patrón típico de daño (Schmidt-Kastner, et al., 1990; Auer, et al., 1989, Graham, 1992) y que el campo CA1 es el más vulnerable (Pulsinelli, 1985). Esto quizá pueda deberse a que la isquemia focal deja un flujo sanguíneo residual, como ya se observó y dado que el GD es la zona con irrigación directa mediante las arterias perforantes, es la región que recibe un abasto energético mayor con respecto a las otras regiones, pero esto condiciona un proceso metabólico citotóxico principalmente por la mayor formación de ácido láctico y por ende la mayor formación de radicales libres, productos que por torrente circulatorio deben llegar hasta el CA1, además este campo corresponde a una zona que presenta características particulares (Sommer, 1880; Willis, et al., 1981; Cotman, et al., 1987; Wyllie, 1993) y donde la hipoperfusión (Pulsinelli, et al., 1982a) se presenta más tarde.

En la condición de **isquemia con recuperación de 7 días** se esperaba que el tejido neural mostrara un fenómeno de maduración como el descrito en los gerbos por Ito, et al., (1975) y que por lo tanto

los cambios en la alteración neuronal se hicieran más francos. Sin embargo los hallazgos encontrados en este trabajo no hacen evidente la presencia de dicho fenómeno, lo que puede explicarse porque el sistema circulatorio del gerbo es diferente al de la rata.

Las zonas que mostraron mayor vulnerabilidad a esta condición de isquemia fueron el CA3 y CA4 en el grupo de 10 minutos. Muy probablemente por ser las zonas que sufren menos los efectos de la reperfusión dado el corto tiempo del período de isquemia. Mientras que la mayor pérdida neuronal se observó en el CA1 en el grupo de 20 minutos. Lo que concuerda con los estudios que reportan que el campo CA1 presenta la mayor alteración funcional a mayor tiempo de postisquemia (Pulsinelli, et al., 1982a; Graham, 1992), debido muy probablemente a la densa inervación excitatoria que recibe, a las características de receptores que han sido reportadas en esta región y a los aspectos metabólicos específicos de la neuronas del CA1 o sector de Sommer (Graham, 1992).

Respecto a la similitud en el decremento de la densidad neuronal en las dos condiciones de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días) observamos una diferencia importante en relación con otros estudios (Pulsinelli, 1985), que pueden explicarse de primera instancia por el modelo de isquemia desarrollado en este trabajo. Mientras que las variaciones morfométricas no fueron tan obvias dado que se sabe que es necesario más tiempo. Fue evidente que a mayor tiempo de isquemia aguda mayor desinhibición. Sin embargo con 20 minutos de isquemia aguda la desinhibición resultó ser similar a la encontrada en el grupo de 5 minutos y la densidad neuronal fue significativamente menor, lo que puede explicarse por la hiperexcitabilidad de las neuronas que sobrevivieron a este período de isquemia (Johansen, et al., 1987).

Respecto a la isquemia con recuperación de 7 días, en el grupo de 5 minutos observamos que la densidad neuronal no disminuyó significativamente, sin embargo los valores del IMI hicieron evidente la desinhibición quizá causada por la hiperexcitabilidad neuronal (Suzuki, et al., 1983; Johansen, et al., 1987), es decir que el potencial de reposo de estas células sea menos electronegativo, por lo que alcanzan más fácilmente el umbral de disparo. En los grupos con tiempos mayores de isquemia con recuperación de 7 días observamos decremento significativo en

la densidad neuronal que en promedio no fue más haya del 27%. En relación con el fenómeno de desinhibición, que a pesar de que está presente, el valor del IMI representa un porcentaje de cambio del 76% con respecto al control y una recuperación del 40% con respecto al grupo de 5 minutos de isquemia. Por lo anterior pensamos que los cambios encontrados desde el punto de vista electrofisiológico y morfométrico no suceden paralelamente, ya que en el grupo de 20 minutos de isquemia aguda observamos la menor densidad neuronal y no así el mayor valor del IMI lo que refleja una menor población celular (específicamente células granulares) con actividad electrofisiológica alterada muy probablemente debido a lesión de otros componentes celulares como interneuronas y células gliales que conforman el circuito funcional completo del hipocampo. Por esta razón consideramos conveniente realizar estudios enfocados a valorar interneuronas y glia, así como aportar nuevos datos morfológicos de las células excitatorias de esta región cerebral.

## Conclusiones

- La isquemia provocada por la oclusión de las arterias carótidas induce alteraciones funcionales y morfológicas significativas.
- La disminución del flujo sanguíneo del hipocampo disminuye significativamente por la oclusión de ambas arterias carótidas comunes.
- En los diferentes grupos con isquemia aguda se observó modificación en la excitabilidad neuronal valorada a través del registro del potencial provocado. Los valores del IMI aumentaron de manera progresiva en función del tiempo de isquemia. Sin embargo en el grupo de 20 minutos el IMI disminuyó sin llegar al valor control. En los grupos de isquemia con recuperación de 7 días, el IMI con valor mayor se observó en el grupo de 5 minutos. En los grupos de 10, 15 y 20 el IMI también mostró la desinhibición en función de la duración del periodo de isquemia. Aunque no hay una relación directamente proporcional de los valores del IMI con el tiempo y tipo de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días).

- La pérdida en la densidad neuronal en ambos hipocampos (derecho e izquierdo) muestra variabilidad, sin que se haga evidente una mayor vulnerabilidad de uno de los hemisferios.
- Desde el punto de vista morfométrico la isquemia aguda respecto a la isquemia con recuperación de 7 días mostró cambios que no fueron sustanciales en la densidad neuronal ni en el tipo de lesión.
- El campo CA1 fue el de menor densidad neuronal a mayor tiempo de isquemia con recuperación de 7 días.
- Las modificaciones observadas tanto en el IMI como en la densidad neuronal sólo mostraron significancia estadística de acuerdo con el tiempo y tipo de isquemia (aguda y con recuperación de 7 días). Sin embargo podemos concluir que con 5 minutos de isquemia focal, la excitabilidad neuronal se altera y la densidad neuronal se modifica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Addison W.H.F., Carr C.J., Creskoff A.J., Farris E.J., Fitz-Hugh T. (1942): **The Rat in Laboratory Investigation**. Griffith J.Q., and Farris E.J., (Eds.) J.B. Lippincott Company. United States of America. 488 pp.
- Alvarez L.F.J, Merediz A.G. y Fernández C.J.R. (1994): Consecuencias de la inhibición de la bomba de sodio en neuronas y su relevancia en la fisiopatología del daño celular producido por isquemia anóxica. **Gacet. Med. Méx.**, **130**:347-354.
- Amaral, D.G. (1978): A Golgi Study of Cell Types in the Hilar Region of the Hippocampus in the Rat. **J. Comp. Neur.**, **182**:851-914.
- Amaral, D.G., and Dent, J.A. (1981): Development of the Mossy Fibers of the Dentate Gyrus: I. A Light and Electron Microscopic Study of the Mossy Fibers and Their Expansions. **J. Comp. Neur.**, **195**:51-86.
- Ames III A, and Nesbett F.B. (1983): Pathophysiology of Ischemic Cell Death: I Time of Onset of Irreversible Damage; Importance of the Different Components of the Ischemic Insult. **Stroke.**, **14**:219-226.
- Ames III A, Wright L., Kowada M., Thurston J.M., and Majno G. (1968): Cerebral Ischemia. II. The No-Reflow Phenomenon. **Am J. Pathol.**, **52**:437-451.
- Ammassari-Teule M., Pavone F., Castellano C. y McGaugh L.J. (1991): Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. **Brain Res.**, **551**:104-109.
- Andersen P., Holmquist B. and Vorhoeve P.E. (1966): Entorhinal activation of dentate granule cells. **Acta Physiol. Scan.** **66**:448-460.
- Araki T., Kato H and Kogure K. (1990): Neuronal damage and calcium accumulation following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil. **Brain Res.**, **528**:114-122.
- Astrup J, Siesjö B.K, and Symon L. (1981): Thresholds in Cerebral Ischemia- The Ischemic Penumbra. **Stroke.**, **12**:723-725.
- Austin, K.B., Bronzino, J.D., and Morgane. (1989): Paired-pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state. **Exp. Brain Res.**, **77**:594-604.
- Bayer S. (1985): Hippocampal region. En: G. Paxinos (Ed.), **The rat nervous system**. Vol. 1., Cap. 8. Academic Press. pp. 335-352.
- Beal M.F., Hyman B.T. and Koroshetz W. (1993): Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?. **Trends Neurosci.**, **16**: 125-131.
- Becker D., and Remondino R.L. (1991): Monitoreo de la presión intracraneana. En: Shoemaker W.C., Ayres S., Grenvik A., Holbrook P.R., y Thompson W.L. (Eds.) **Tratado de medicina crítica y terapia intensiva**. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires., pp. 325-330.
- Benveniste H., Drejer, J., Schousboe A., Diemer, N.H. (1984): Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurochem.**, **43**:1369-1376.
- Bilkey, D.K. and Goddard, G.V. (1985): Medial Septal Facilitation of Hippocampal Granule Cell Activity is Mediated by Inhibition of Inhibitory Interneurons. **Brain Res.**, **361**: 99-106.

- Blackstad T.W. (1956): Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J. Comp. Neurol.**, **105**:417-537
- Brainteberg. V., and Schütz, A. (1983). Some Anatomical Comments on the Hippocampus. In: **Neurobiology of the Hippocampus**, by Seifert W. U.S.A., Academic Press. pp. 21-37.
- Bravo J., Solís H., y Meza E. (1987): Aplicación iontoforética de Leu-encefalina en la corteza somatosensorial de la rata. **Archivos INNyN.**, **2**: 46.
- Bravo J., Galindo J.A., Chávez J.L., y Solís H. (1990): Modulación de la excitabilidad neuronal del hipocampo por antagonistas de aminoácidos excitatorios. **Archivos INNyN.**, **5**: 37.
- Bravo, M. J. (1991): **Modificación de la Inhibición Recurrente por la Estimulación Eléctrica Iterativa o por la Administración de Fármacos Convulsionantes**. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. 133 pp.
- Brierley J.B. and Excell B.J. (1966): The effect of profound systemic hypotension upon the brain of M. Rhesus. Physiological and pathological observations. **Brain**, **89**:269-298.
- Brierley J.B., Meldrum B.S. and Brown A.W. (1973). The Threshold and Neuropathology of Cerebral "Anoxic-Ischemic" Cell Change. **Arch Neurol.**, **29**:367-374.
- Brierley J.B. (1977): Cerebral hypoxia. In: W. Blackwood and J.A.N. Corsellis (Eds). **Greenfield's Neuropathology**. Year Book Medical Publishers, Edinburg, pp. 43-85.
- Broderick P.A. and Gibson G.E. (1989): Dopamine and serotonin in rat striatum during in vivo hypoxic-hypoxia. **Met. Brain Dis.**, **4**: 143-153.
- Brown, A.W. (1977): Structural abnormalities in neurons. **J. Clin. Pathol.**, **30**: **Suppl.** **11**:155-169.
- Brown A.W., Levy D.E., Kublik M., Harrow J., Plum F., and Brierley J.B. (1979): Selective Chromatolysis of Neurons in the Gerbil Brain: A Possible Consequence of "Epileptic" Activity Produced by Common Carotid Artery Occlusion. **Ann Neurol.**, **5**:127-138.
- Brust J.C.M. (1991): Cerebral Circulation: Stroke. En: Kandel E. R., Schwartz J.H. and Jessell T.M (Ed.) **Principles of neural science**. Appleton & Lange. USA. pp. 1041-1049.
- Buchan, A. (1992): Advances in Cerebral Ischemia: Experimental Approaches. **Neurologic Clinics**, **10**:49-61.
- Buckmaster P., Strowbridge G. and Schwartzkroin P. (1993): A comparison of rat hippocampal mossy cells and CA1 pyramidal cells. **J. Neurophysiol.**, **70**:1281-1299.
- Buzsáki G. (1984): Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. **Prog. Neurobiol.**, **22**:131-153.
- Buzsáki G., Freund T.F., Bayardo F., and Somogyi P. (1989). Ischemia-induced changes in the electrical activity of the hippocampus. **Exp Brain Res.**, **78**:268-278.
- Cajal, R.S. (1955): **Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertebrates**. Tomo II. Madrid.. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto Ramón y Cajal. pp. 681-715.
- Carafoli E. (1987): Intracellular calcium homeostasis. **Ann Rev. Biochem.**, **56**: 395-433.
- Carpenter, R.H.S. (1986): **Neurofisiología**. Ed. Manual Moderno. México. pp. 231-253, 353-367.
- Carregal E. J.A. (1975). The site of anoxic block in the spinal monosynaptic pathway. **J. Neurobiol.**, **6**:103-113.

- Cervantes A. J.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 de doctorado en Ciencias Biomédicas. México., 86 pp.
- Cohan S.L, Mun S.K, Petite J, Correia J, Da Silva A.T, and Waldhorn R.E. (1989): **Cerebral Blood Flow in Humans Following Resuscitation From Cardiac Arrest.** *Stroke.*, **20**:761-765.
- Contreras, G.A. (1994): **Análisis electrográfico del sueño en gatos sometidos a isquemia-anoxia cerebral global aguda.** Tesis de doctorado en Ciencias Fisiológicas. México.
- Cotman C.W., A. Foster and T. Lanthorn (1981): An overview of glutamate as a neurotransmitter. Glutamate as a Neurotransmitter. G di Chiara and G.L. Gessa (Eds). *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **27**, pp.1-29.
- Choi D.W. (1989): NMDA antagonist and hypoxic neuronal injury. *J. Neurosur. Anesth.*, **1**: 357-359.
- Curtis D.R., Duggan A.W. and Johnston G.A.R. (1971): The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the mammalian spinal cord. *Exp. Brain. Res.*, **12**:547-565.
- Darle V., Stone D., Smith D. and Martin J. (1991): Mitochondria, oxygen and reperfusion damage. *Ann Med.*, **23**:583-588.
- De Felipe, J. and Jones, E.G. (1988): **Cajal on the cerebral cortex and annotated translation of the Complete Writing.** U.S.A., Oxford University Press. pp. 289-362.
- Dearden N.M. (1985): Ischaemic Brain. *The Lancet* **3**:255-259.
- DeCourten-Meyers G., Myers R.E. and Schoolfield L. (1988). Hyperglycemia enlarges infarct size in cerebrovascular occlusion in cats. *Stroke*, **19**: 623-630.
- DeGirolami U, Crowell R.M. and Marcoux F.W. (1984): Selective Necrosis and Total Necrosis in Focal Cerebral Ischemia. Neuropathologic Observations on Experimental Middle Cerebral Artery Occlusion in the Macaque Monkey. *J. Neurophathol. Exp. Neurol.*, **43**:57-71.
- Diemer N.H. and Siemkowicz E. (1980): Increased 2-deoxyglucose uptake in hippocampus, globus pallidus and substantia nigra after cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.*, **61**:56-63
- Diemer N.H., Jorgensen M.B., Johansen F.F., Sheardown M. and Honoré T. (1992): Protection against ischemia hippocampal CA1 damage in the rat with a new non-NMDA antagonist, NBQX. *Acta Neurol. Scand.*, **86**: 45-49.
- Dienel G.A. (1984): Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J. Neurochem.*, **43**:913-925.
- Dingledine, R. and Gjerstad, L. (1980): Reduces inhibitions during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *J. Physiol.*, **305**:297-313
- Drewes L.R., Gilboe D.D. and Betz A.L. (1973): Metabolic Alterations in Brain During Anoxic-Anoxia and Subsequent Recovery. *Arch Neurol.*, **29**:385-390.
- Eklöf B. and Siesjö B.K. (1972a): The Effect of Bilateral Carotid Artery Ligation upon the Blood Flow and the Energy State of the Rat Brain. *Acta Physiol. Scand.*, **86**:155-165.
- Eklöf B. and Siesjö B.K. (1972b): The Effect of Bilateral Carotid Artery Ligation upon Acid-Base Parameters and Substrate Levels in the Rat Brain. *Acta Physiol. Scand.*, **86**:528-538.
- Ernster L. (1988): Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit. Care Med.*, **16**:947-953.
- Escobar, A. (1986): Nuevos Conceptos sobre la significación morfo funcional del sistema limbico. *Bol. Estud. Méd. Biol., Méx.*, **34**:25-34.

- Fishman R.P. (1975): Brain Edema. **N. England J. Med.**, **293**: 706.
- Flamm E.S., Demopoulos H.B., Seligman M.L., Poser G.R. and Ransohoff J. (1978): Free radicals in cerebral ischemia. **Stroke**, **9**: 445-447.
- Folbergrová J., Kiyota Y., Pahlmark K., Memezawa H., Smith M. and Siesjö B. (1993): Does ischemia with reperfusion lead to oxidative damage to proteins in the brain?. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, **13**: 145-152.
- Francis, A. and Pulsinelli, W.A. (1982): Response of GABAergic and cholinergic neurons to transient cerebral ischemia. **Brain Res.**, **243**:271-278.
- Frank, J.A.E., Schwartzkroin, P.A., and Phillips J.O. (1989): The Limbic System. In: **Textbook of Physiology**. Vol. I. by Patton H.D. et al. 21a. Ed. U.S.A., W.B. Saunders Company. pp. 693-717.
- Fredens, K., Stengaard-Pedersen K. and Larsson L.I. (1984): Localization of enkephalin and cholecystokinin immunoreactivities in the perforant path terminal fields of the rat hippocampal formation. **Brain Res.**, **304**:255-263.
- Freund T.F., Antal, M. (1988): GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. **Nature.**, **336**:170-173.
- Gaarskjaer, F.B. (1978): Organization of the Mossy Fiber System of the Rat Studied in Extended Hippocampi. **J. Comp. Neur.**, **178**: 49-72.
- Galindo M.J.A. (1991): **Efecto de la propionamida sobre la inhibición recurrente del hipocampo**. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. México., 90 pp.
- Galindo M.J.A., Bravo M.J., López H.E. y Solís H. (1992): Efectos del baclofeno sobre la excitabilidad neural en el hipocampo. **Archivos INNyN.**, **7**: 64.
- Ganon, W.F. (1990): **Fisiología Médica**. Duodécima Ed. México.. Ed. Manual Moderno. pp. 220-230.
- Ganon W.F. (1996). **Fisiología Médica**. 15a. ed. Ed. El Manual Moderno. México. 962 pp.
- García, R.M. (1994): **Cambios en la citoarquitectura del hipocampo y en la ejecución de una tarea de aprendizaje por efecto de la desnutrición hipoproteica**. Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas. 134pp.
- García-Ugalde G., y Brailowsky S. (1993): Los receptores del GABA: De la electrofisiología a la biología molecular. **Ciencia**: **44**: 279-289.
- Garoutte, B. (1983): **Neuroanatomía Funcional**. Ed. EL Manual Moderno. México. pp.67-68.
- Ghosh A, and Greenberg M.E. (1995): Calcium Signaling in Neurons: Molecular Mechanisms and Cellular Consequences. **Science.**, **268**:239-247.
- Gill R, Nordholm L, and Lodge D. (1992): The neuroprotective actions of 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemia model. **Brain Res.**, **580**:35-43.
- Gimbrome M.A., Brock A.F. and Schafer A.L. (1984): Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, **77**:1233-43.
- Ginsberg, M.D. (1990): Local metabolic responses to cerebral ischemia. **Cerebrovascular and brain metabolism reviews.**, **2**:58-93.

- Gjedde A., Hansen A.J., and Siemkowicz E. (1980): Rapid simultaneous determination of regional blood flow and blood-brain glucose transfer in brain of rat. *Acta Physiol Scand.*, **108**:321-330.
- González M.A. (1995): **Densidad de las células GABAérgicas en la formación hipocámpica de la rata desnutrida.** Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. México.
- González V. M.D., Escobar, A., Cervantes, M., Morali, G., Ruelas, R. y Avila A. (1996): **Efectos de la progesterona sobre la despoblación neuronal del hipocampo provocada por isquemia-anoxia cerebral global aguda en el gato.** Resúmenes del XXXIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México. 071.
- Gordon J. (1991): Spinal Mechanisms of Motor Coordination. In: Kandel E.R., Schwartz J.H., and Jessell T.M. (Eds.) *Principles of Neural Science.* Apleton & Lange. United States of America. pp. 581-595.
- Graham D.I. (1992). Hypoxia and vascular disorders. In: Adams J.H. and Duchen L.W. (Eds.) *Greenfield's Neuropathology.* Edward Arnold. Great Britain. pp. 153-268.
- Gutiérrez G. (1991): Cellular energy metabolism during hypoxia. *Critical Care Medicine.*, **19**:619-626.
- Hallenbeck, J. and Furlow. (1979): Prostaglandin I<sub>2</sub> and indomethacin prevent impairment of posts ischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke*, **10**:629-637.
- Halliwel B. and Gutteridge J. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**:1.
- Hansen A.J. and Lundbaek J.A. (1989): Ion distributions in brain during ischemia. *J. Neurosurg. Anesth.*, **1**: 353-356.
- Harris, K.M. and Teyler, T.J. (1984): Development onset of long term potentiation in area CA-1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.*, **346**:27-48.
- Heinemann, U., Konnerth, A., Lourel, J., Lux, D.H. and Pumain R. (1982): Changes in extracellular free Ca<sup>2+</sup> in normal and epileptic sensorimotor cortex of cats. In: Klee M.R., Lux D.H. and Spekmann, J.E. (Eds). *Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena.* Raven Press. New York. pp. 29-35.
- Heiss W.D. (1983): Flow Thresholds of Functional and Morphological Damage of Brain Tissue. *Stroke.*, **14**:329-331.
- Heiss W.D. (1993): El infarto cerebral. El gran desconocido de los males circulatorios. *Prescripción Médica.*, **185**:1-2.
- Hertz L. (1981): Features of astrocyte function apparently involved in the response of central nervous tissue to ischemia-hypoxia. *J. Cereb. Blood Metab.*, **1**:143-155.
- Hillered L. and Chan P.H. (1988): Role of arachidonic acid and other fatty acids in mitochondrial dysfunction in brain ischemia. *J. Neurosci. Res.*, **20**: 451-456.
- Hossmann K.A. and Kleihues P. (1973). Reversibility of Ischemic Brain Damage. *Arch. Neurol.*, **29**:375-384.
- Hossmann K.A. and Zimmermann V. (1974). Resuscitation of the monkey brain after 1 H complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, **81**:59-74.
- Iino, M., Ozawa, S., and Tsuzuki, K. (1990): Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.*, **424**:151-165.

Ikeda M., Nakazawa T., Abe K., Kaneko T. and Yamatsu K. (1989): Extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus induced by ischemia is not calcium dependent in vitro and in vivo evidence. **Neurosci Lett.**, **96**: 202-206.

Ito U., Spatz M., Walker J. and Klatzo I. (1975): Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **Acta Neuropathol. (Berl)** **32**:209-223.

Jaramillo, M.J.J., Bravo, M.J., Galindo, M.J.A., y Solis, O.H. (1991): Modificaciones en la Inhibición Recurrente del Hipocampo de la rata por la administración de Halotano e Isoflurano. **Rev. Mex. Anest.**, **14**:153-161.

Johansen, F.F., Jorgensen, M.B. and Diemer, N.H. (1983): Resistance of Hippocampal CA-1 Interneurons to 20 min of Transient Cerebral Ischemia in the Rat. **Acta Neuropathol (Berl)**, **61**: 135-140.

Johansen, F.F., Jorgensen, M.B. and Diemer, N.H. (1986): Ischemia induced neuronal death in the CA1 hippocampus is dependent on intact glutamatergic innervation. In: Hicks, T.P., Lodge, D. and McLennan H. (Eds). **Excitatory amino acid transmission**. Alan R. Liss. New York., **24**:245-248.

Johansen, F.F., Zimmer, J. and Diemer, N.H. (1987): Early loss of somatostatin neurons in the dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss. **Acta Neuropathol (Berl)** **73**:110-114.

Johnson, B. (1955): Strychnine paroxysms in brain stem. I Anatomical distribution. **J. Neurophysiol.**, **18**:189-199.

Jorgensen M.B. Diemer N.H. (1982): Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: Possible role of transmitter glutamate. **Acta Neurol Scandinav.**, **66**:536-546.

Jorgensen, M.B., Johansen, F.F., and Diemer, N.H. (1987): Removal of the entorhinal cortex protects hippocampal CA-1 neurons from ischemic damage. **Acta Neuropathol. (Berl)**, **73**:189-194.

Kalimo, H., Garcia, J.H., Kamijyo, Y., Tanaka, J. and Trump, B.F. (1977): The ultrastructure of brain death. Electronmicroscopy of feline cortex after complete ischemia. **Virchows Arch. B. Cell Pathol.**, **25**:207-220.

Kamphuis, W., Wadman, W.S., Bruijs, R.M and Lopes da Silva, F.H. (1986): Decrease in number of hippocampal gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactive cells in the rat kindling model of epilepsy. **Exp. Brain Res.**, **64**: 491-495.

Kandel, E.R., Spencer, W.A. and Brinley, F.J. (1961): Electrophysiology of Hippocampal Neurons. I Sequential Invasion and Synaptic Organization. **J. Neurophysiol.**, **24**: 225-242.

Kaplan J, Dimlich R.V.W, Biros M.H. and Hedges J. (1987): Mechanisms of Ischemic Cerebral Injury. **Resuscitation.**, **15**:149-169.

Kappers, A., Huber, C. and Crosby, E.C. (1967): **The Comparative Anatomy of the nervous system of vertebrates, including man**. U.S.A., Hafner Publishing Company. Volume tree, pp.1411-1423.

Kapur J. and Lothman E.W. (1989a): Loss of Inhibition Precedes Delayed Spontaneous Seizures in the Hippocampus After Tetanic Electrical Stimulation. **J. Neurophysiol.**, **61**: 427-434.

- Kapur J., Stringer J.L. and Lothman E.W. (1989b): Evidence that repetitive seizures in the hippocampus cause a lasting reduction of GABAergic inhibition. **J. Neurophysiol.**, **61**: 417-426.
- Kass I.S, Abramowicz E. and Cottrell J.E: (1989): Brain Metabolism During Ischemia and Anoxia. **J. Neurosurg. Anesth.**, **1**:264-266.
- Katchman A.N. and Hershkowitz N. (1993): Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. **J. Neurophysiol.**, **70**: 1-7.
- Klatzo, I. (1967): Presidential address. Brain Edema. **J. Neuropath. Exp. Neurol.**, **26**:11-14.
- Klüver, H. and Bucy P.C. (1939). Preliminary Analysis of Function of the Temporal Lobes in Monkeys. **Arch. Neurol. and Psychiat.**, **42**:979-1000.
- Kosaka T., Hama K. and Yen Wu J. (1984): GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. **Brain Res.**,**293**:353-359
- Krause, G S, White B.C, Aust S.D, Nayini N.R and Kumar K. (1988): Brain cell death following ischemia and reperfusion: A proposed biochemical sequence. **Critical Care Medicine**, **16**:714-726.
- Krnjevic, K. (1982): Loss of synaptic inhibition as a cause of hippocampal seizures. In: Klee, M.R. (Ed). **Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena**. Raven Press, New York. pp.123-130
- Krnjevic K. (1990). Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels in Anoxia. **Stroke**: **21**: III-190-III-193.
- Kun, P.Ch., McCulloch, J., Ki, K.J. and Rak, Ch. Ch. (1992): Efficacy of D-CPPene, a competitive N-methyl-D-aspartate antagonist in focal cerebral ischemia in the rat. **Neurosc. Lett.**, **147**:41-44.
- Kuschinsky W., Wahl M., Bosse O. and Thurau K. (1972): Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. **Circ. Res**, **31**:240-247.
- Lacaille J-C., Kunkel D.D. and Schwartzkroin P.A. (1989): Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. En: Victoria Chan-Palay and Christer Köhler (Ed.) **The hippocampus-New Vistas**. Alan R. Liss, Inc. New York. pp.287-305.
- Lauberg, S. (1979): Commissural and Intrinsic Connection of the Rat Hippocampus. **J. Comp. Neur.**,**184**:685-708.
- Leblond, J. and Krnjevic, K. (1989): Hypoxic Changes in Hippocampal Neurons. **J. Neurophysiol.**, **62**:1-14.
- Lees G.J. (1991): Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res. Rev.**, **16**: 283-300.
- Lewis, P.R. and Shute, C.C.D. (1967): The cholinergic limbic system: Projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supraoptic crest. **Brain**,**90**: 521-540.
- Lipton P. and Whittingham T.S. (1982). Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the *in vitro* guinea-pig hippocampus. **J. Physiol.**, **325**: 51-65.

- Ljunggren B, Schutz H., and Siesjö B.K. (1974): Changes in energy state and acid-base parameters of rat brain during complete compression ischemia. **Brain Res.**, 73: 277-289.
- López Antunez, L. (1979): **Anatomía Funcional del Sistema Nervioso**. Ed. Limusa. México. pp. 573-581.
- Lorente de Nó R. (1934): Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. **J. Psychol. Neurol.**, 46:113-177.
- Lutz, P.L. and Nilsson G.E. (1994): **The Brain without Oxygen. Causes of Failure and Mechanisms for Survival**. Medical Intelligence Unit, U.S.A. 117pp.
- Lloyd, K.G., Munari C., Bossi, L. and Morselli, P.L. (1984): Neurochemical evidence for the GABA hypothesis of human epilepsy. In: Porter, R.J., Porter, R.H., Mattson, A.A., Ward Jr. and Dams M. (Eds). **Advances in epileptology. XV<sup>th</sup> Epilepsy Int. Symp.** Raven. New York. pp. 3-7.
- MacDonal, R.L. and Barker, J.L. Penicillin and pentylenetetrazol selectively antagonize GABA-mediated postsynaptic inhibitions of cultured mammalian neurons. **Neurology**, 27:337.
- Marcoux F.W, Morawetz R.B, Crowell R.M, DeGirolami U. and Halsey J.H. (1982): Differential Regional Vulnerability in Transient Focal Cerebral Ischemia. **Stroke**, 13:339-346.
- Marinkovic, S.V., Milisavljevic, M.M. and Vuckovic, V.D. (1991): Microvascular Anatomy of the Uncus and the Parahippocampal Gyrus. **Neurosurgery.**, 29:805-814.
- Marshall L.F., Welsh F., Durity F., Lounsbury R., Graham D.I., Path M.R.C. and Langfitt T.W. (1975a). Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part. 3: Brain energy metabolism. **J. Neurosurg.**, 43: 323-328.
- Marshall L.F., Graham D.I., Path M.R.C., Durity F., Lounsbury R., Welsh F. and Langfitt T.W. (1975b). Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part. 2: Brain morphology. **J. Neurosurg.**, 43:318-322.
- Marshall, L.F., Durity, F., Lounsbury, R., Graham, D.I., Path, M.R.C., Welsh, F., Langfitt, W. (1975c): Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part. I **J. Neurosurg.**, 43:308-317.
- Martínez R.H.R. (1991): Fisiopatología de la Isquemia Cerebral. En: Barinagarrementeria F (Ed). **Enfermedad Vascular Cerebral**. Instituto Syntex. México. pp 27-53.
- Meldrum, B.S. (1981): Metabolic effects of prolonged epileptic seizures and the causation of epileptic brain damage. F. Clifford Rose (Ed). **Metabolic Disorders of the Nervous System**. Pitman, London.
- Meldrum, B. (1990): Protection against ischemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. **Cerebrovascular and brain metabolism reviews.**, 2:27-57.
- Meldrum B.S. (1995): Excitatory Amino Acid Receptors and their role in epilepsy and cerebral ischemia. **Annals New York Academy of Sciences.**, 757:492-505.
- Meyer, A. (1936): The selective regional vulnerability of the brain and its relation to psychiatric problems. **Proc. Roy. Soc. Med.**, 29:1175-1181.
- Meyer, J.E. (1953): Über die lokalisation frühkindlicher hirneschäden in arteriellen grenzgebieten. **Arch. Psychiat. Nervenkr.**, 190:328-341.
- Meza E., Bravo J y Solís H. (1987): Localización de neuronas sensibles al glutamato en la corteza sensitivo motora de la rata. **Archivos INNyN.**, 2: 42.

- Molinari G.F. and Laurent J.P. (1976): A Classification of Experimental Models of Brain Ischemia. **Stroke.**, 7:14-17
- Moreno-Sánchez R. (1985a): Inhibition of oxidative phosphorylation by a  $Ca^{2+}$  induced diminution of the adenine nucleotide translocation. **Biochim. Biophys. Acta.**, 724:278-285.
- Moreno-Sánchez R. (1985b): Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free  $Ca^{2+}$  concentration. **J. Biol. Chem.**, 260:4028-4034.
- Morgane P.J., La France R.A., Bronzino J., Tonkiss J., Díaz-Cintra S., Cintra L., Kemper T. and Galler J.R. (1993): Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci. Biobehav. Revs.** p.p.91-128
- Murray R.K, Granner D.K., Mayes P.A. y Rodwell V.W. (1992). **Bioquímica de Harper.** 12a. ed. Ed. El Manual Moderno. México. 740 pp.
- Myers R.E. (1979): A unitary theory of causation of anoxic and hypoxic brain pathology. **Adv. Neurol.**, pp.195-213, ed. S. Fahn et al. Raven Press, New York.
- Nadler, J.V., Vaca K.W., White W.F., Lynch G.S. and Cotman C.W. (1976): Aspartate and glutamate as a possible transmitters of excitatory hippocampal afferents. **Nature (Lond.)**, 260:538-540.
- Nadler, J.V., White, W.F., Vaca, K.W., Perry, B.W. and Cotman C.W. (1978): Biochemical correlates of transmission mediated by glutamate and aspartate. **J. Neurochem.**, 31: 147-155.
- Nauta, W.J.H. (1958): Hippocampal projections and related neural pathways to the mid-brain in the cat. **Brain.** 81:319-340.
- Nauta W. and Feitarg M. (1987): **Fundamentos de Neuroanatomía.** Ed. Labor. España.
- Navarro R.C.E. (1991). Metabolismo Cerebral en Isquemia. En: Velez A. H., Rojas M. W., Borrero R. J. y Restrepo M.J. (Eds.), **Fundamentos de Medicina. Neurología.** Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia, pp 345-351.
- Nedergaard, M., Astrup, J. and Klinken L. (1984): Cell Density and Cortex Thickness in the Border Zone Surrounding Old Infarcts in the Human Brain. **Stroke**, 15:1033-1039.
- Nedergaard M. (1988): Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. **Acta Neurol. Scand.**, 77:81-101.
- Nemoto E.M. (1979): Studies on the pathogenesis of ischemic brain damage and its amelioration by barbiturate therapy. K.J. Zülch and W. Kaufman (Eds). **Brain and Heart Infarct II.** pp.306-317.
- Netter, F.H. (1991): **Sistema Nervioso. Anatomía y Fisiología.** Salvat Ed. Barcelona-España. pp. 27-28, 132.
- Newberry, N.R. and Nicoll, R.A. (1984): Direct hyperpolarizingaction of baclofen on hippocampal pyramidal cells. **Nature**, 308:450-452.
- Noback, Ch.R. y Demarest, R.J. (1981): **Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología.** McGraw-Hill. México. pp. 329-337.
- Nobak Ch. R., Strominger N.L. y Demarest R.J. (1993). **El sistema nervioso.** 4a. ed. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. México. pp 57-65.
- Noebels, J.L. and Prince, D.A. (1977): Presynaptic origin of penicillim after discharge at mammalian nerve terminals. **Brain Res.**, 138:59-74.

Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R., Liu G.J. and Floyd R.A. (1990): Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, **87**: 5144-5147.

Opic, L.H. and Dphil M.D. (1989): Reperfusion injury and its pharmacologic modification. **Circulation**, **80**:1049-1062.

Ottersen O.P. and Storm-Mathisen J. (1989): Excitatory and inhibitory amino acids in the hippocampus. En: Victoria Chan-Palay and Christer Köhler (Ed.) **The hippocampus-New Vistas**. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 97-117.

Paljärvi L., Rehnroona S., Soderfeldt B., Olsson Y. and Kalimo H. (1983): Brain lactic acidosis and ischemia cell damage: quantitative ultrastructural changes in capillaries of rat cerebral cortex. **Acta Neuropathol (Berl)**, **60**:232-240.

Park Ch.K., McCulloch J, Ki Kang J, and Rak Choi Ch. (1992): Efficacy of D-CPPene, a competitive N-methyl-D-aspartate antagonist in focal cerebral ischemia in the rat. **Neurosci. Lett.**, **147**:41-44.

Park, M.R., Lighthall, J.W., and Kitai S. (1980): Recurrent inhibition in the rat neostriatum. **Brain Res.**, **194**: 359-369.

Parra G.L. (1995): **Alteraciones neuroanatómicas del hipocampo y de algunos procesos cognitivos en ratas sometidas a una dieta hipoproteica postnatal**. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. México. 82 pp.

Petito C.K. (1979): Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **38**:222-234.

Petito C.K., Pulsinelli W.A., Jacobson G. and Plum F. (1982): Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: Comparison between ischemic neuronal damage and infarction. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **41**:423-36

Petito C.K. and Pulsinelli W.A. (1984): Sequential Development of Reversible and Irreversible Neuronal Damage Following Cerebral Ischemia. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **43**:141-153.

Plum F. (1973): The Clinical Problem: How Much Anoxia-Ischemia Damages the Brain?. **Arch. Neurol.**, **29**:359-360.

Plum F., Posner J.B. (1982). **Estupor y Coma**. 2a. Ed. Ed. El Manual Moderno. México. 483 pp.

Plum, F. (1983): What causes infarction in ischemic brain. The Robert Wartenberg Lecture. **Neurol.**, **33**:222-233

Pluta R., Lossinsky A.S., Mossakowski M.J., Faso L. and Wisniewski H.M. (1991): Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. **Acta Neuropathol.**, **83**:1-11.

Pulsinelli, W.A., Brierley J.B. (1979): A New Model of Bilateral Hemispheric Ischemia in the Unanesthetized Rat. **Stroke**, **10**: 267-272.

Pulsinelli W.A., Levy D.E, Duffy T.E. (1982a): Regional Cerebral Blood Flow and Glucose Metabolism Following Transient Forebrain Ischemia. **Ann Neurol.**, **11**:499-509.

Pulsinelli W.A., Brierley J.B, and Plum F. (1982b): Temporal Profile of Neuronal Damage in a Model of Transient Forebrain Ischemia. **Ann Neurol.**, **11**:491-498.

- Pulsinelli W.A., Duffy T.E. (1983): Regional Energy Balance in Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia. **J. Neurochem.**, **40**:1500-1503.
- Pulsinelli, W.A., Duffy, T.E., Levy, D.E., Petito, C. and Plum, F. (1984): Ischemic injury to selectively vulnerable neurons in the rat. In: A.Bes, P. Braquet, R. Paoletti and B.K. Siesjö (Eds). *Cerebral Ischemia*, ICS 654. Excerpta Medica. Amsterdam-New York-Oxford, pp.35-44.
- Pulsinelli W.A. (1985): Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog. Brain Res.**, **63**:29-37.
- Racine, R.J., Milgram, N.W. and Hafner S. (1983): Long term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. **Brain Res.**, **260**:217-231.
- Raichle M.E. (1983): The Pathophysiology of Brain Ischemia. **Ann Neurol.**, **13**:2-10.
- Rehncrona S., Rose I. and Siesjö B.K. (1980): Excessive cellular acidosis: an important mechanism of neuronal damage in brain?. **Acta Physiol Scand.**, **110**: 435-437.
- Rehncrona S., Westerberg E., Akesson B. and Siesjö B.K. (1982). Brain Cortical Fatty Acids and Phospholipids During and Following Complete and Severe Incomplete Ischemia. **J. Neurochem.**, **38**:84-93.
- Reynold, F.A. and Oakley, C.S. (1984): The colchicine experimental epileptic focus: and intracellular study. **Brain Res.**,**322**:326-328.
- Ribak, C.E., Bradburne, R.M. and Harris, A.B. (1982): A preferential loss of GABAergic, symmetric synapses in epileptic foci: A quantitative ultrastructural analysis of monkey neocortex. **J. Neurosci.**, **2**:1725-1735.
- Ribak C. E., Seress, L. (1983): Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. **J. Neurocyt.**, **12**: 577-597.
- Ribak, C.E. (1985): Axon Terminals of GABAergic handler Cells Are Lost At Epileptic Foci. **Brain Res.**, **326**: 251-260.
- Ribak, C.E., Hunt, C.A., Bakay, R.A.E. and Oertel, W.H. (1986): A decrease in the number of GABAergic somata is associated with the preferential loss of GABAergic terminals at epileptic foci. **Brain Res.**,**363**:78-90.
- Roberts, E. (1984): GABA-related phenomena, models of nervous system functions and seizures. **Ann Neurol.**, **16**:S 77-S 89.
- Rolfen M.L. and Davis W.R. (1989): Cerebral function and preservation during cardiac arrest. **Critical Care Medicine.**, **17**: 283-292.
- Romero A., López E., y Solís H. (1995): Cambios en la excitabilidad neuronal del hipocampo de ratas sometidas a isquemia-anoxia cerebral. **Gacet. Med. Méx.**, **131**: 43.
- Rosdahl D.R., Seitzberg D.A., Christensen T., Balchen T. and Diemer N.H. (1994): Changes in mRNA for metabotropic glutamate receptors after transient cerebral ischaemia. **NeuroReport.**, **5**:593-596.
- Rose, M. (1927): Der allocortex beim tier und mensch. **J. Psychol. Neurol.**, **34**:1-111.
- Sainsbury, R.S., Heynen, A. and Montoya Ch.P. (1987): Behavioral Correlates of Hippocampal Type 2 Theta in the Rat. **Physiology and Behavior.**, **39**:513-519.
- Sauter A. and Rudin M. (1995). Strain-Dependent Drug Effects in Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **274**:1008-1013.
- Schmidley J.W. (1990): Free radicals in central nervous system ischemia. **Stroke.**, **21**: 1086-1090.

- Schmidt-Kastner R., Grosse Ophoff B. and Hossmann K-A. (1990): Pattern of neuronal vulnerability in the cat hippocampus after one hour of global cerebral ischemia. **Acta Neuropathol.**, 79:444-455.
- Scholz W. (1953): Selective neuronal necrosis and its topistic patterns in hypoxemia and olegemia. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 12:249-261.
- Scholz W. (1963): Topistic lesions. In: J. P. Schadé and W. H. McMenemy (Eds). **Selective vulnerability of the brain in hypoxemia**. F.A. Davis Co., Philadelphia, pp.257-267.
- Scholz W. and Albus U. (1993): Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. **Basic. Res. Car.**, 88:443-445.
- Schwartzkroin, P.A. and Wyler A.R. (1980): Mechanisms underlyingm epileptiform burst discharge. **Ann. Neurol.**, 7:95-107.
- Seress, L., Ribak, C.E. (1983): GABAergic Cells in the Dentate Gyrus Appear to be Local Circuit and Projection Neurons. **Exp. Brain Res.**, 50: 173-182.
- Seress, L. and Ribak Ch. (1988): The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. A immunocytochemical study. **Develop Brain Res.**, 44: 197-209.
- Seubert, P., Lee K. and Lynch, G. (1989): Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. **Brain Res.**, 492:366-370.
- Shephred, G.M. (1990): **The synaptic organization of the brain**. Shephred (Ed), Oxford University Press., 561 pp.
- Siesjö B.K. (1978): **Brain Energy Metabolism**. New York: John Wiley.
- Siesjö B.K. (1981): Cell damage in the brain: A speculative synthesis. **J. Cereb. Blood Floww Metab.**, 1:155-185.
- Siesjö B.K. (1992): Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. **J. Neurosurgery.**, 77: 169-184.
- Siesjö B.K. and Katsura K. (1992): Ischemic brain damage: focus on lipids and lipid mediators. **Adv. Exp. Med. Biol**, 318: 41-56.
- Silver I.A. and Erecinska M. (1990). Intracellular and Extracellular Changes of [Ca<sup>2+</sup>] in Hypoxia and Ischemia in Rat Brain In Vivo. **J. Gen. Physiol.**, 95:837-866.
- Silverman H.S. (1993): Mitochondrial free calcium regulation in hypoxia and reoxygenation; relation to cellular injury. **Basic Res. Cardiol.**, 88:483-494.
- Simonsen, A.H. (1973): Some Intrinsic Connections of the Hippocampus in the Rat: An Experimental Analysis. **J. Comp. Neur.** 147: 145-162.
- Simmonds, M.A. (1978): Presynaptic actions of aminobutyric acid and some antagonists in a slice preparation of cuneate nucleus. **Br. J. Pharmacol.**, 63:495-502
- Slater, N.T., Steizer, A. and Galvan, M. (1985): Kindling-like stimulus patterns ibduce epileptiform discharges in the guinea pig in vitro hippocampus. **Neurosci. Lett.**, 60:25-31.
- Sloviter, R.S. (1983): "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I Acute electrophysiology and light microscopic study. **Brain Res Bull.**, 10:675-697.
- Smedly L.A., Tonnesen M.G., Sandhaus R.A. (1986): Neutrophil mediated injury to endotelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. **J. Clim. Invest.**, 77:1233-43.

Smith M.L., Auer R.N. and Siesjö. (1984): The Density and Distribution of Ischemic Brain Injury in the Rat Following 2-10 min of Forebrain Ischemia. **Acta Neuropathol (Berl)**, **64**:319-332.

Solís H., Bravo J., Galindo J.A. y López E. (1991): Modulación de la inhibición recurrente por antagonistas de aminoácidos excitatorios y bloqueadores de calcio. **Archivos INNyN.**, **6**: 133.

Solís, O.H., Bravo, M.J., Galindo, M.J.A. (1991): Modificación de la inhibición recurrente por la estimulación eléctrica iterativa o por la aplicación local de fármacos convulsionantes al hipocampo. En: E. Otero y S. Brailowski (Eds). **Epilepsia Experimental. Series de Neurología.** No. 2. Academia Mexicana de Neurología, A.C. y Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. México. pp.211-223.

Solís H., López H.E., Galindo M.J.A. y Bravo J. (1992): Modificación de la inhibición recurrente en el hipocampo de ratas sometidas a isquemia-anoxia cerebral aguda. **Archivos del INNyN.**, **7**: 64.

Solís H., López E., Galindo J.A. y Bravo J. (1993): Modulación de la inhibición recurrente en el hipocampo: Evidencia de la participación del receptor GABA<sub>A</sub>. **Archivos INNyN.**, **8**: 153.

Sommer W. (1880): Erkrankung des Ammonshorns als etiologisches moment der epilepsie. **Arch. Psychiatr. Nervenkr.**, **10**:631-675.

Spielmeier W. (1925): Zur pathogenese der örtlich elektiven gehirnveränderungen. **Z. Neurol. Psychiat.**, **99**:756-777.

Steen P.A., Michenfelder J.D. and Milde J.H. (1979): Incomplete versus Complete Cerebral Ischemia: Improved Outcome with a Minimal Blood Flow. **Ann Neurol.**, **6**:389-398.

Steward, O., Scoville, S.A. (1976): Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. **J. Comp. Neur.** **169**: 347-370.

Stringer, L.J., Williamson, M.J. and Lothman W.E. (1989): Induction of paroxysmal discharges in the dentate gyrus: frequency dependence and relationship to afterdischarge production. **J. Neurophysiol.**, **62**(1):126-135

Suzuki, R., Yamaguchi T., Li, C.L. and Klatzo I. (1983): The effects of 5-minute ischemia in mongolian gerbils: II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. **Acta Neuropath.**, **62**:217-222.

Suzuki, T., Nishimura, Y. and Tonoue, T. (1991): Three-dimensional trajectories of the hippocampal rhythmic slow activity in the behaving rat. **Behaviour. Brain Res.**, **44**: 35-41.

Swanson, L.W. (1983): The Hippocampus and the Concept of the Limbic System. In: Seifert W. (Ed.) **Neurobiology of the Hippocampus.** Academic Press. U.S.A. pp. 3-19.

Tanaka K, Fukuuchi Y, Gomi S, Takashima S, Mihara B, Shirai T, Nogawa S, Nozaki H, and Nagata E. (1993): Reduction in Second-Messenger Ligand Binding Sites After Brain Ischemia- Autoradiographic B<sub>max</sub> and K<sub>d</sub> Determinations Using Digital Image Analysis. **Brain Res. Bull.**, **32**:49-56.

Taylor C.P., Geer J.J. and Burke S.P. (1992): Endogenous extracellular glutamate accumulation in rat neocortical cultures by reversal of the transmembrane sodium gradient. **Neurosc. Lett.**, **145**: 197-200.

- Tellez F, Carvajal K, García C, Vásquez C, Chávez E. y Moreno-Sánchez R. (1996): Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia y reperfusión en el miocardio. **Arch. Inst. Cardiol. Méx.**, **66**:162-181.
- Torvik A, and Svindland A. (1986): Is there a transitional zone between brain infarcts and the surrounding brain?. A histological study. **Acta Neurol. Scand.**, **74**:365-370.
- Tsubokawa H, Oguro K, Robinson H.P.C, Masuzawa T. and Kawai N. (1995): Single glutamate channels in CA1 pyramidal neurones after transient ischaemia. **NeuroReport.**, **6**:527-531.
- Tuff, L.P., Racine, R.J. and Adamec, R. (1983): The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I paired pulse depression. **Brain Res.**, **277**:79-90.
- Tyson G.W., Teasdale G.M., Graham D.I. and McCulloch J. (1984): Focal Cerebral Ischemia in the Rat: Topography of Hemodynamic and Histopathological Changes. **Ann Neurol.**, **15**:559-567.
- Vogt, C. and Vogt, O. (1937): Sitz und wesen der krankheiten im lichte der topistischen himnforschung und des variierens der tiere. **J. Psychol. Neurol.**, **47**:237-457.
- Uematsu, D., Greenberg, J. H., Reivich, M. and Karp, A. (1988): In Vivo Measurement of Cytosolic Free Calcium During Cerebral Ischemia and Reperfusion. **Ann Neurol.**, **24**:420-428.
- Von Lubitz D.E. and Diemer N.H. (1982): Complete cerebral ischemia in the rat: An ultrastructural and stereological analysis of the distal stratum radiatum in the hippocampal CA-1 region. **Neuropath. Appl. Neurobiol.**
- Waalas, I. (1983): The hippocampus. En: Emson, P.C. (Ed). **Chemical Neuroanatomy**. Raven Press. New York, pp337-358.
- Watson B. (1984): Lipid peroxidation in vivo induced by reversible global ischemia in rat brain. **J. Neurochem.**, **42**:268-274.
- Welbourn C., Golman G. and Paterson I.S. (1991): Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrofil. **Br. J. Surg.**, **78**:651-655.
- Welsh F. and Langfitt T.W. (1975). Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part. 2: Brain morphology. **J. Neurosurg.**, **43**: 318-322.
- West, J.B. (1986): **Bases fisiológicas de la práctica médica**. Best y Taylor. 11a.Ed. Ed. Med. Panamericana. Buenos Aires-Argentina. pp. 1393-1395.
- Wieloch T., Siesjö B.K. (1982): Ischemic brain injury: the importance of calcium, lipolytic activities and free fatty acid. **Pathol. Biol.**, **30**:269-277.
- Williams V. and Grossman R.G. (1969). Ultrastructure of Cortical Synapses after Failure of Presynaptic Activity in Ischemia. **Anat. Rec.**, **166**: 131-142.
- Willis W., Grossman R. (1981): **Medical Neurobiology**. Neuroanatomical and Neurophysiological Principles Basic to Clinical Neuroscience. U.S.A., . The C.V. Mosby Company. pp. 417-432.
- Witter M.P. (1989): Connectivity of the rat hippocampus. En: Victoria Chan-Palay and Christer Köhler (Eds.) **The hippocampus-New Vistas**. Alan R. Liss, Inc., New York., pp.53-69.
- Wyllie, E. (1993): **The treatment of Epilepsy**. Principles and Practice. U.S.A., . Ed. Lea and Febiger. pp. 31-35.
- Wyss J.M. (1981): An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **199**:495-512.

Wyss J.M., Swanson L.W. and Cowan W.M. (1979): A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. **Neuroscience**, **4**:463-476.

Yoshida S. (1980): Effect of transient ischemia on free fatty acid and phospholipids in the gerbil brain. Lipid peroxidation as possible cause of post-ischemic injury. **J. Neurosurg.**, **53**:323-331.

Yoshida S. (1985): Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: modification by dietary vitamin. **E. J. Neurochem.**, **44**:1593.

Zaleska M., Floyd R. (1985): Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron. **Neurochem. Res.**, **10**:397.

Zeman W., and Maitland I.J.R. (1963): **Craigie's Neuroanatomy of the Rat**. Academic Press, New York, USA. 230 pp.

Zülch, K.J. (1953): Neue befunde und deutungen aus der gefässpathologie des hirns und rückenmarks. **Z. Pathol. Pathol. Anat.**, **90**:402.