

30362

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

NEUROPROTECCIÓN PROFILÁCTICA CON SULFATO DE MAGNESIO, ETOMIDATO Y METILPREDNISOLONA EN NEURONAS PIRAMIDALES DE ÁREA CA1 Y CA3 DE HIPOCAMPO DORSAL EN GERBOS SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN NEUROCIENCIAS  
P R E S E N T A:  
GLORIA ADRIANA CASTRO PACHECO



IMSS

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

2001



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.

## **COMITÉ DE TESIS**

### **DOCTOR ISRAEL GRIJALVA OTERO**

Jefe de la Unidad de Investigación Médica de  
Enfermedades Neurológicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI.  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **MAESTRA MARIA ROSA AVILA COSTA**

Profesor Asociado  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
Universidad Nacional Autónoma de México

### **DOCTOR JORGE BERNAL HERNÁNDEZ**

Profesor Titular  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
Universidad Nacional Autónoma de México

### **MAESTRA LAURA COLIN BARENQUE**

Profesor Asociado  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
Universidad Nacional Autónoma de México

### **DOCTOR MARIO RODRIGUEZ CAMACHO**

Profesor Titular  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
Universidad Nacional Autónoma de México

## INDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
1.- INTRODUCCIÓN.....	10
2.- ANTECEDENTES	
2.1.- Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	11
2.2.- Mecanismos de lesión cerebral durante la reperfusión.....	15
2.3.- Modelo de isquemia cerebral en gerbos.....	16
2.4.- Daño selectivo a isquemia-reperfusión.....	28
3.- ANATOMÍA DE LA CIRCULACIÓN ARTERIAL DE CEREBRO DE GERBO.....	21
4.- ANATOMIA Y FISIOLOGÍA DE HIPOCAMPO.....	24
5.- CONDICIONES PARA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN GERBOS.....	28
5.1.- Bases de la neuroprotección .....	29
5.2.- Neuroprotección profiláctica.....	33
5.3.- Asociación de fármacos.....	33
6.- FARMACOCINETICA DE NEUROPROTECTORES	
6.1.- Etomidato.....	34
6.2.- Sulfato de magnesio.....	35
6.3.- Metilprednisolona.....	36
7.- JUSTIFICACIÓN.....	39
8.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
9.- HIPÓTESIS.....	40
10.- OBJETIVOS.....	40
11.- MATERIAL Y MÉTODO	
11.1.- Población y tamaño de la muestra.....	42
11.2.- Cuidados generales.....	42
11.3.- Diseño general.....	42
11.4.- Criterios de selección.....	43

<b>11.5.- Procedimientos</b>	
11.5.a.- Administración de fármacos.....	44
11.5.b.- Oclusión de arterias carótidas .....	44
11.5.c.- Cuidados postoperatorios.....	46
11.5.d.- Obtención del tejido y preparación histológica.....	46
11.5.e.- Método de Nissl (para cortes de parafina).....	47
<b>11.6.- Métodos de análisis</b>	
11.6.a.-Análisis histológico.....	48
11.6.b.-Método estadístico.....	48
11.6.c.-Consideraciones éticas.....	49
<b>12.- RESULTADOS</b>	
12.1.- Análisis estadístico.....	51
12.2.- Análisis morfológico.....	51
<b>13.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>14.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>15.- PERSPECTIVAS A FUTURO.....</b>	<b>69</b>
<b>16.- REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>

## ABREVIATURAS

ACC	arteria carótida común
ACM	arteria cerebral media
ACP	arteria cerebral posterior
AcP	arteria comunicante posterior
AEE	aminoácido excitatorio
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-4-propionato
AMPc	adenosinmonofosfato cíclico
ATP	adenosintrifosfato
ATPasa	adenosintrifosfato sintetasa
CA1	<i>Cornu Ammonis 1</i>
CA2	<i>Cornu Ammonis 2</i>
CA3	<i>Cornu Ammonis 3</i>
Ca <sup>2+</sup>	calcio
Ca <sup>2+</sup> i	calcio intracelular
CCE	cambios celulares edematosos
CCI	cambios celulares isquémicos
Cl <sup>-</sup>	cloro
CoA	acetil coenzima A
D.E	desviación estándar
D1	receptor de dopamina 1
EEG	electroencefalograma
ETO	etomidato
Fe <sup>2+</sup>	hierro
FSC	flujo sanguíneo cerebral
g	gramo
GABA-A	receptor A del ácido gama amino butírico
h	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
KA	kainato

L-AP4	ácido L-2 amino - 4 fosfonobutanoico
μm	micrometros
min	minuto
mL	mililitro
mm Hg	milímetros de mercurio
MP	metilprednisolona
Na <sup>+</sup>	sodio
Na <sup>+</sup> / Ca <sup>2+</sup>	bomba sodio-calcio
NaCl	cloruro de sodio
Na-K-ATPasa	bomba sodio-potasio-adenosintrifosfato sintetasa
NMDA	receptor N-metil-D-aspartato
-OH	hidroxilo
O <sup>2</sup>	oxigeno molecular
°C	grados Celsius
p.e	por ejemplo
PGF <sub>2α</sub>	prostaglandina F 2 alfa
s	segundos
SM	sulfato de magnesio
SNC	sistema nervioso central
trans ACPD	1S-3R-trans-1 amino-ciclopentil-1,2 dicarboxilato
TxA <sub>2</sub>	tromboxano A2

## RESUMEN

**INTRODUCCION.** La lesión celular en la isquemia cerebral es originada por mecanismos principalmente relacionados con la disminución o pérdida del suministro de oxígeno y glucosa al tejido cerebral, seguido de una serie eslabonada de alteraciones metabólicas y bioquímicas que concluyen con la muerte celular. Dependiendo de la severidad y duración del evento isquémico ciertas áreas del cerebro y poblaciones neuronales son más vulnerables. La neuroprotección profiláctica busca intervenir en alguna etapa de la cascada isquémica, para retrasar, atenuar o evitar el daño por isquemia-reperfusión, entre estas sustancias destacan los atrapadores de radicales libres y los inhibidores de la excitotoxicidad, como los antagonistas del calcio y los antagonistas competitivos y no competitivos de los receptores NMDA. **OBJETIVO** Evaluar y comparar el tratamiento profiláctico con sulfato de magnesio (SM), etornidato (ETO) y metilprednisolona (MP) sobre el número de neuronas piramidales viables en área CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de gerbos sometidos a isquemia-reperfusión. **MATERIAL Y METODO.** Se utilizaron 56 gerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) machos, de 70-80g de peso. Se formaron 8 grupos de 7 animales cada uno, de acuerdo a sorteo, 7 grupos fueron sometidos a oclusión carotídea bilateral durante 20 minutos, 6 de estos grupos recibieron fármacos ( MP, ETO, SM, SM+ETO, SM+MP, MP+ETO ) y uno no; el grupo 8 se utilizó como sham. Después de siete días, los cerebros fueron extraídos para evaluación histológica, mediante cortes coronales seriados de 9µm, teñidos con violeta de cresilo (técnica de Nissl). El conteo y análisis celular se realizó con microscopia de luz, en el mismo sector por cada área de hipocampo dorsal y se expresó como el número de neuronas intactas en 500 µm de longitud de la capa

piramidal. RESULTADOS. En CA1 demostraron un efecto neuroprotector significativo ( $p < 0.05$ ) MP+ SM, MP, ETO, ETO+MP, siendo el grupo de SM;y ETO+SM dañinos para la población neuronal; en el área CA3, MP, ETO, ETO+MP, SM+MP, ETO+SM, fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ), no así el grupo de SM que aumento el daño celular. CONCLUSIONES. Los fármacos evaluados, demostraron un efecto neuroprotector en neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal al ser administrados de manera profiláctica. Las asociaciones de los fármacos no demostraron mayor beneficio que las administraciones aisladas en ninguno de los casos para cada área evaluada, a excepción del SM, el cual administrado solo o asociado a ETO ocasionó mayor daño, principalmente en las células del área CA1 comparado con los grupos de isquemia.

## ABSTRACT

The cellular damage for cerebral ischemia is originated by diverse mechanisms, mainly those related with the decrease or loss of the oxygen supply and glucose to the cerebral tissue and those that associate to an answer of the nervous cells, as a result of a linked series of metabolic and biochemical alterations that they will conclude with the cellular necrosis. It also exists a vulnerability that is selective to certain areas of the brain and neuron populations, which depends on the severity and duration of the ischemic event. In recent years, the term has arisen of " prophylactic neuroprotection ", as a result of the search of an early protection to the damage for ischemia - reperfusion, for they have been evaluated it substances denominated neuroprotectors or cytoprotectors, with theoretical capacity of influencing in some stage of the ischemic cascade, among those that the antagonists of the calcium and the competitive and not competitive antagonists of the receiving NMDA highlight. The objective of this work was to quantify viable pyramidal neurons in area CA1 and CA3 from dorsal hippocampus of subjected gerbil to ischemia-reperfusion, with administration prophylaxis of sulfate of magnesium (SM), etomidate (ETO) and metylprednisolone (MP), in an isolated way and in association. For such an effect gerbil of Mongolia was used (*Meriones unguiculatus*) males, of 70 - 80g of weight, distributed in a random way in eight experimental groups. The drugs was administered from a previous way to the occlusion. Later on, was carried out bilateral occlusion of arteries common carotids during 20 minutes, by means of clamps for aneurysms. The animals underwent the same immediate and late postoperative conditions (access to water and food), after seven days, the brains were extracted to carry out histological evaluations. They were carried out courts you crown them seriates of 9  $\mu\text{m}$ , which were tinted with cresil violet (technique of Nissl). The count and cellular

analysis were carried out with microscopy of light, in the same sector for each area of dorsal hippocampus and it was expressed as the number of intact neurons in 500  $\mu\text{m}$  of longitude of the pyramidal stratum. The isolated administrations that demonstrated effect neuroprotector in the area CA1 were MP and ETO and the beneficent associations corresponded SM + MP and ETO + MP. In the area CA3 the association of MP + SM and of ETO + MP demonstrated bigger preservation of cells, the same as the administration MP, and ETO. In a general way, was an increase average of 20% in the number of viable neurons, compared with the groups without treatment. However, the associations of the drugs not demonstrate bigger benefit that the administrations isolated in none of the cases for each evaluated area, to exception of the SM, the one which alone administered or associated to ETO it caused bigger damage, mainly in the cells of the area CA1 compared with the ischemia groups.

The evaluated drugs, they demonstrated an effect neuroprotector in pyramidal neurons of the areas CA1 and CA3 from dorsal hippocampus when being administered in way prophylaxis, however, due to the necessary opposing, serious percentage of viable cells to explore different dose and times of administration to know if bigger benefit can exist.

## 1.- INTRODUCCION

La isquemia cerebral puede ocasionar diversos grados de lesión, que van de pérdida axonal parcial hasta muerte neuronal. Este daño se produce como resultado directo de la disminución del flujo sanguíneo cerebral que condiciona una falla bioenergética, y lesión celular, a través de varios mecanismos: la excitotoxicidad, la formación de especies reactivas de oxígeno, el desarrollo de acidosis y la entrada de calcio iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en la célula, entre otros ( Wurtman, 1999. Castillo, 2000 ). La lesión celular que provoca la isquemia cerebral tiene lugar en dos fases: el daño propiamente por isquemia y el asociado a la fase de reperfusión y reoxigenación tisulares. Gran parte del daño ocasionado por la isquemia es mediado por la formación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) durante la fase de reperfusión cerebral ( Hass, 1983; Diez-Tejedor, 1996; Macaya, 2000 ).

La isquemia cerebral como un proceso complejo y heterogéneo, no puede ser tratado óptimamente con una única sustancia ( Cottrell, 1995a; Cottrell, 1995b; Basile, 1999; Mostacero, 1999; Gozes, 2000; Less, 2000 ), por eso es importante la evaluación a nivel experimental de combinaciones de sustancias neuroprotectoras, que puedan aumentar las posibilidades de éxito.

En esta tesis se evaluó el efecto de la neuroprotección profiláctica con fármacos administrados de manera aislada y asociada para determinar la preservación de las células piramidales de hipocampo dorsal en un modelo de isquemia-reperfusión en gerbos.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL .

El cerebro es muy sensible al daño producido por hipoxia e isquemia debido a sus altos requerimientos metabólicos, bajos almacenes de oxígeno y pequeñas reservas de fosfatos de alta energía ( Dugan, 1994; Díez-Tejedor, 1996 ), de esta manera, el daño isquémico en el cerebro es causado por una combinación de importantes factores fisiopatológicos que interactúan de una manera compleja.

La isquemia cerebral puede ser focal o global. Durante la isquemia focal el flujo sanguíneo cerebral es interrumpido en una región particular y el daño ocasionado depende de la existencia de circulación colateral que perfunde parcialmente el área que rodea al centro de la isquemia ( Farber, 1981 ). En cambio, durante la isquemia global, existe ausencia total de flujo sanguíneo ( Raichle, 1983 ). La fisiopatología de la isquemia cerebral a nivel molecular ha sido descrita y documentada en varios trabajos (García, 1984; Siesjö, 1992a; Siesjö 1992b; Basile, 1999, García, 1999; Wurtman, 1999; Carden, 2000; Ironside, 2000; Neumar, 2000; White, 2000 ).

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al daño y muerte neuronal por isquemia, se encuentran los directamente relacionados con la disminución o pérdida del suministro de oxígeno y glucosa al tejido y dependen de la duración y severidad del evento isquémico. Se sabe que la reducción del FSC por debajo de 20 ml / min. / 100 g de tejido produce falla de la actividad eléctrica, y por debajo de 10 ml / min / 100g de tejido produce disminución del gradiente iónico transmembranal (Wurtman, 1999 ).

En condiciones normales el cerebro utiliza glucosa y oxígeno para la producción de ATP. Durante la isquemia, se acelera el consumo de oxígeno y disminuye la

fosforilación oxidativa, ocasionando una baja producción de ATP por glicolisis anaerobia. Al ser comprometida la función mitocondrial por disminución del suministro de oxígeno, el reciclado de protones por la fosforilación oxidativa disminuye y su concentración en citosol se incrementa, ocasionando disminución de los nucleótidos de adenina para la mitocondria por inhibición del transporte de  $\text{ATP-Mg}^{2+}/\text{Pi}$ . También se inhibe el recambio de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en el plasmalema, causando secuestro de calcio intracelular de  $(\text{Ca}^{2+})_i$  ( Dienel, 1984; Dugan, 1994 ).

La concentración de calcio  $(\text{Ca}^{2+})$  en el citosol de las neuronas está regulado por una variedad de bombas en la membrana y otros sistemas de recambio. De esta manera, la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  puede originar desde degeneración hasta la muerte neuronal. (Dienel, 1984; Carafoli, 1988; Aronowski, 1992; Nakamura, 1999 ), debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  activa múltiples enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por arriba de los niveles fisiológicos lleva a la degradación incontrolada de macromoléculas de importancia vital para la estructura y función celulares ( Dugani, 1994; Kristian; 1998; Jiménez 1996; García, 1999 ).

El cerebro es el tejido más desprotegido del organismo en cuanto a su capacidad de defensa antioxidante (Jesberger, 1991). Existe una elevada probabilidad de formación del anión radical superóxido  $(\text{O}_2^-)$  debido al elevado consumo de oxígeno en el cerebro y a la relativa abundancia de enzimas que lo generan como producto colateral. Este radical es transformado en peróxido de hidrógeno  $(\text{H}_2\text{O}_2)$  por acción de la superóxido dismutasa. La ausencia de catalasa cerebral y el contenido relativamente bajo de glutatión peroxidasa, que reducen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua, conducen a la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  precursor potencial de radicales hidroxilo  $(\cdot\text{OH})$ , que son extremadamente reactivos

(Demopoulos, 1980; Kitagawa, 1990; Traystman 1991). En condiciones de isquemia cerebral, la disfunción mitocondrial incrementa la reducción univalente del oxígeno y, por tanto, la generación de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$ . La transformación de  $H_2O_2$  en  $\cdot OH$  es catalizada por el ion hierro ( $Fe^{2+}$ ) que es abundante en el tejido cerebral y cataliza además la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en radicales, los cuales tienen actividad vasoconstrictora y están involucrados en reacciones radicales en cadena y en la formación de moléculas reactivas con ácidos grasos y proteínas (Dugan, 1994; Jimenez, 1996; Jesberger, 1991).

Teniendo en cuenta que el cerebro es abundante en ácidos grasos poliinsaturados, que son los sustratos preferenciales de los radicales libres del oxígeno, resulta fácil comprender por que es órgano blanco de las reacciones de peroxidación. El daño secundario a los lípidos estructurales y libres en el tejido neuronal, que inducen el rompimiento de los fosfolípidos de membrana y la acumulación de ácidos grasos libres, atentan contra la integridad estructural de las biomembranas. Durante estadios iniciales de la isquemia, los glicerofosfolípidos de inositol aumentan el ácido araquidónico y diacilglicerol libres. Esta formación de ácido araquidónico resulta del rompimiento transneuronal acelerado de los glicerofosfolípidos de inositol por la liberación de glutamato en la hendidura sináptica durante el daño isquémico (Panetta, 1989; Rabin, 1997, 1998). La liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa  $A_2$  activada por  $Ca^{2+}$ , es el punto de partida para la formación de eicosanoides. La ciclooxigenasa genera peróxidos lipídicos precursores de  $PGF_{2\alpha}$  y  $TxA_2$ , todos ellos constrictores de la musculatura lisa vascular. (Rabin, 1998; García 1999).

Las concentraciones altas de ácidos grasos libres promueven la liberación de glutamato y evitan su recuperación, inhiben la Na-K-ATPasa; y sus propiedades detergentes pueden cambiar la fluidez y la permeabilidad de la membrana, lo que altera los mecanismos de los que dependen la integridad de la misma ( Dugan, 1994; Rabin 1997).

Se sabe que durante el episodio isquémico se produce una liberación indiscriminada de neurotransmisores. La liberación de AEE, principalmente glutamato, ha sido mencionada como factor clave en la excitotoxicidad observada en la isquemia, especialmente por la estimulación sostenida de los receptores NMDA y AMPA que conducen a la muerte neuronal mediada por la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  (Siesjö, y cols. 1991; Sommer, 2000; Martin, 2000 ). El término de excitotoxina y excitotoxicidad describen las acciones neurotóxicas de los aminoácidos, particularmente los análogos estructurales de glutamato, tales como el ácido kaínico. El glutamato es el principal aminoácido neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos; es mediador de diferentes respuestas celulares por interacción con al menos cinco subtipos de receptores, llamados N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-4-propionato (AMPA), ácido L-2 amino-4-fosfonobutanoico (L-AP4) e IS-3R-*trans*- 1-amino-ciclopentil-1,3 dicarboxilato (*trans* ACPD) ( Choi, 1990, 1992; Dugan, 1994; Gagliardi, 2000 ).

El daño neuronal inducido por glutamato involucra dos eventos distintos, primero, la exposición prolongada de las neuronas a glutamato puede causar un edema neuronal agudo resultado de una despolarización mediada por el flujo de  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y agua. (Pellegrini, 1990; Dugan, 1994 ), se sugiere que el agua que entra a la célula causa lisis

osmótica, el segundo evento, se caracteriza por el flujo excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente por sobreactivación de receptores NMDA y AMPA. (Pizzi, 1996).

El efecto final común de los mediadores fundamentales del daño por isquemia es, por tanto, la destrucción de componentes estructurales y funcionales de la célula y el daño secundario en la microcirculación que, por diversos mecanismos (edema y lesión endotelial, formación de agregados celulares, alteración de la permeabilidad y reactividad vascular) ocasiona el denominado "fenómeno de no reflujo", cerrando el círculo y perpetuando el proceso ( Ames, 1968; Harrison 1975; Im Dahl 1986; Díez-Tejedor, 1996; Lipton 1999 ).

## **2.2.- MECANISMOS DE LESION CEREBRAL DURANTE LA REPERFUSION**

Otro evento adverso en la lesión neuronal, es el producido durante la reperfusión, el cual potencia los mediadores del daño isquémico ya existente y adiciona nuevos elementos como la producción y liberación de radicales libres, enzimas lisosomales, la oxidación de las moléculas reducidas acumuladas durante la isquemia, el aumento de la actividad de la óxido-nítrico sintetasa y la producción de radicales libres derivados de óxido nítrico, el incremento de la liberación de neurotransmisores y aminoácidos excitadores, el aumento de los niveles de calcio en las células, etc ( McCord, 1985; Díez-Tejedor, 1996; Odinak, 1999; Nakamura, 1999 ).

Además, durante la recirculación los ácidos grasos libres son utilizados rápidamente, en particular el ácido araquidónico, el cual después de ser acumulado durante la isquemia es metabolizado durante la reperfusión vía ciclo de lipoxigenasa y ciclooxigenasa para producir prostaglandinas, tromboxanos y superóxido, así como metabolitos tóxicos de oxígeno que son dependientes de la degradación de ATP (Philips, 1996; Rabin, 1997;

Uhl, 2000). También aumenta la conversión de xantina dehidrogenasa a xantina oxidasa por proteasas que son activadas por calcio. La vía de xantina oxidasa es muy importante en las células endoteliales para la producción de superóxido durante la reperfusión (McCord; 1985; Patt, 1988; Panetta, 1989; Oliver, 1990; Traysman, 1991; Delsoppo, 1994; Macaya, 2000\_).

El daño por reperfusión también depende del tiempo que se haya mantenido la reducción del FSC. Por tanto, el fenómeno fundamental y desencadenante de la lesión celular durante la isquemia es la reducción del FSC, pero pasada la primera fase, los mediadores bioquímicos del daño por reperfusión adquieren una especial relevancia, llegando a ser responsables directos de la continuación del daño ( Patt, 1987 ).

### **2.3.- MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL EN GERBOS.**

En la actualidad de todos los modelos animales que incluyen gatos, perros, conejos, roedores y primates, para investigar el proceso de enfermedad vascular cerebral y para evaluación de métodos de manejo terapéutico del daño por hipoxia-isquemia, los modelos en roedores son los más utilizados ( Wiebwers, 1990; Zivin, 1990; Small, 2000). Los roedores presentan más ventajas sobre otros modelos (Molinari, 1988; Garcia, 1984 ): Bajo costo de los animales, bajo costo de los procedimientos, homogeneidad relativa para los procesos, semejanza de anatomía cerebrovascular y fisiología con especies superiores, tamaño cerebral pequeño, que permite buenos procedimientos de fijación o análisis bioquímicos, aceptación dentro de las perspectivas éticas y ecológicas.

Los principales modelos para producción de isquemia cerebral global son en rata, la oclusión de cuatro vasos o la oclusión de dos vasos combinado con hipotensión; en el gerbo la oclusión de dos vasos ( Lipton, 1999 ).

A).- OCLUSION DE 4 VASOS EN RATA. La oclusión de cuatro vasos en la rata involucra coagulación permanente de arterias vertebrales y ligadura temporal de las dos arterias carótidas comunes (ACC). En la rata Wistar, después de 15 segundos (s), el FSC se reduce 3% de los valores controles en hipocampo, estriado y neocorteza. El EEG generalmente es isoelectrico después de 30-40 s y la actividad cortical espontánea es abolida después de 1 minuto a temperatura de 37°C.

B).- OCLUSION DE 2 VASOS EN RATA. Esto involucra solamente ligadura de las ACC, con una reducción de la presión sanguínea de ~ 50 mmHg. El EEG es isoelectrico a 15-25s.

C).- OCLUSION DE 2 VASOS EN GERBOS. La isquemia cerebral global en gerbos de Mongolia es inducida por ligadura temporal de las ACC sin necesidad de reducción en la presión sanguínea, debido a la ausencia de arterias comunicantes posteriores, lo que produce isquemia cerebral global. Los cambios son similares al modelo en rata; el FSC en corteza es <1% y en hipocampo ~4% de los valores controles, mientras que la falla EEG ocurre después de 20 s.

En los modelos de isquemia cerebral por oclusión de vasos en ratas, se presenta isquemia incompleta, a causa del flujo sanguíneo residual; sin embargo el modelo de isquemia cerebral global en gerbos, por oclusión bilateral de ACC ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los cambios morfológicos por isquemia-reperfusión y para evaluar fármacos neuroprotectores debido a que se produce isquemia completa con la oclusión de dos vasos (Siesjö, 1992a; Siesjö, 1992b; Basile, 1999; Herguido, 1999b;

Uno, 1999; Wurzman, 1999; Ironside, 2000; Neumar, 2000).

En 1966 Levine y Payan describieron que el gerbo de Mongolia sometido a ligadura unilateral de la arteria carótida común (ACC) es susceptible de desarrollar infarto cerebral y signos de daño neurológico. Desde entonces el modelo en gerbos ha sido ampliamente utilizado para la investigación de la isquemia cerebral por oclusión bilateral y unilateral de la ACC (Ginsberg, 1989).

La principal ventaja de la oclusión unilateral o bilateral de ACC en el modelo en gerbos es la conveniencia del procedimiento quirúrgico simple, el cual permite que muchos animales puedan ser estudiados en corto tiempo. Además con la oclusión bilateral de ACC, el FSC llega casi a cero (0.5 ml / min / 100 g) ( Ohno, 1984), mientras que en otras especies, como la rata, el flujo sanguíneo residual es de aproximadamente 10 ml / min / 100 g de tejido (Crockard, 1980).

En este modelo experimental, se ha observado isquemia completa y constante de los hemisferios cerebrales, además de presentar diversas respuestas clínicas secundarias a la isquemia como ptosis, hemiparesia, giros, convulsiones clónicas y generalizadas. (Kenneth, 1972, Ginsberg, 1989 ).

#### 2.4.- DAÑO SELECTIVO A ISQUEMIA-REPERFUSION.

Algunas poblaciones neuronales presentan vulnerabilidad selectiva a la lesión por isquemia global, como las células de capas mediales de la corteza cerebral (3 y 5), y los sectores CA1, CA3 y CA4 de hipocampo, algunas porciones del núcleo caudado y las células de Purkinje (Araki, 1989), presentando diversas respuestas a la lesión de acuerdo al grado y duración del evento.

Las neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo son selectivamente más

vulnerables a periodos cortos de isquemia cerebral (Kirino, 1982; Nitatori, 1995; Gorter, 1997; Snider, 1999; Martín, 2000). Se ha descrito que las neuronas que se encuentran entre el área del *subiculum* y la región medial de CA1 y las de regiones laterales de CA1 y la región CA3 del hipocampo son más vulnerables a isquemia cerebral en gerbos. (Akai, 1993).

En 1982, Kirino describió tres tipos de cambios morfológicos al daño por isquemia en CA4, CA2 y CA1: cambios celulares isquémicos, cambios celulares reactivos y "muerte neuronal retardada", respectivamente. Reportes subsecuentes en evaluaciones de cortos periodos de isquemia (5-10 min.) describen cambios con dispersión celular en CA4 y cambios reactivos en CA2, en el área CA1 se presenta un proceso de muerte celular por apoptosis. Posteriormente también se describieron cambios celulares isquémicos con periodos prolongados de isquemia (20-30 min) en CA1 (Kirino, 1984b).

Una característica importante de la lesión por isquemia global, es un retraso entre la aparición de los daños celulares y el inicio de eventos de la cascada isquémica, que generalmente ocurre entre 12 h y varios días. Esta "muerte neuronal retardada" fué documentada en ratas por Levy ( 1974 ) y Pulsinelli ( 1992 ) y en gerbos por Kirino (1982 ) y ha sido más estudiada en la región CA1 del hipocampo, pero el estriado, parte de la región CA4 del hipocampo y las capas 2 y 5 en corteza cerebral, también presentan este fenómeno en respuesta a cortos períodos de daño.

De manera general, el hipocampo del gerbo es ligeramente más sensible a hipoxia - isquemia que el de la rata. En el gerbo, las neuronas de la región hiliar y estriatal mueren mucho más rápidamente que las células piramidales de CA1 sin embargo, de manera interesante, es necesario un daño más importante y de mayor duración para iniciar la muerte en neuronas estriatales que en neuronas del hipocampo. Esto

representa una disociación entre factores que inician el daño y los involucrados en su desarrollo ( Kirino, 1982 ).

## CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE MUERTE CELULAR POR NECROSIS.

Al parecer existen tres formas de daño que participan en la muerte celular por isquemia (Lipton, 1999):

### 1. CAMBIOS CELULARES POR EDEMA O CELULAS PÁLIDAS (CCE).

La principal característica de los cambios celulares por edema es la ausencia y pérdida de estructura del citoplasma por el edema celular, que ocurre como resultado de la irregularidad o pérdida de la membrana plasmática y en consecuencia por la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ . El citoplasma limpio implica pérdida de proteínas y de la estructura del citoesqueleto, el núcleo puede presentar un agrupamiento irregular de cromatina, lo que se denomina cromatolisis periférica. ( Kalimo, 1982 ).

### 2. CAMBIOS CELULARES ISQUÉMICOS ( CCI)

Esta etapa contrasta con CCE, ya que la membrana plasmática y la membrana nuclear son muy irregulares, debido a la contracción celular, dando a la célula una forma triangular (en 2 dimensiones), en el citoplasma se encuentran inclusiones citoplásmicas, con algunas vacuolas grandes (1-2  $\mu\text{m}$  diámetro). existe también encogimiento y oscurecimiento del núcleo, el nucleolo adquiere la apariencia de panal de abejas. La contracción del citoplasma es ocasionada por la proteólisis masiva y por disminución del volumen celular por la activación de los canales  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}$  que favorecen la salida de agua y  $\text{Na}^+$  intracelular. Debido a que los cambios celulares isquémicos no aparecen inmediatamente después de una isquemia completa prolongada, se propone que sea necesaria la reperfusión para la amplificación y continuación de la cascada lesiva.

(Kalimo, 1982 ). En algunas ocasiones, las células isquémicas coexisten con células edematosas de CA1 en modelos de isquemia global en gerbos y ratas.

En microscopia de luz, estas células son intensamente eosinofílicas lo cual es característico de este estadio morfológico.

### **3. CAMBIOS CELULARES HOMOGENEIZADOS / CELULAS FANTASMA**

En esta etapa, el citoplasma se encuentra encogido y aparece fragmentado por pequeñas vesículas y cuerpos densos, pero se mantiene como una estructura delimitada; el núcleo se encuentra encogido y oscuro, con la membrana fragmentada y con un agrupamiento anormal de la cromatina. La integridad nuclear es mantenida mas tiempo que la integridad citoplásmica. Las células son pálidas y pueden ser eosinofílicas, con apariencia de "fantasma". Este estadio generalmente sigue al de CCI, y depende de la localización del área cerebral y el tiempo de isquemia ( García, 1995 ).

### **3.- ANATOMIA DE CIRCULACION ARTERIAL DE CEREBRO DE GERBO**

La susceptibilidad en la respuesta al daño neurológico por ligadura bilateral de ACC se atribuye a una variante en la anastomosis de la circulación cerebral en gerbos (Levine y Payan, 1966). Los estudios histológicos realizados en 1969 por Levine y Sohn habían demostrado que no existe comunicación entre la circulación carotídea y la vertebro-basilar. Kenneth en 1972, demostró la ausencia de arterias comunicantes posteriores en la base del cerebro después de realizar inyección de látex en el sistema arterial. Harrison (1975) en 10 especímenes examinados reportó que en ninguno existía arteria comunicante posterior. Levy en 1974, describió que la arteria basilar comunicaba con la circulación carotídea en 6 especímenes a través de las arterias cerebelosas superiores o de otros vasos de 30-60  $\mu\text{m}$  de diámetro que cruzaban rostralmente la superficie

(Kalimo, 1982 ). En algunas ocasiones, las células isquémicas coexisten con células edematosas de CA1 en modelos de isquemia global en gerbos y ratas.

En microscopia de luz, estas células son intensamente eosinofílicas lo cual es característico de este estadio morfológico.

### **3. CAMBIOS CELULARES HOMOGENEIZADOS / CELULAS FANTASMA**

En esta etapa, el citoplasma se encuentra encogido y aparece fragmentado por pequeñas vesículas y cuerpos densos, pero se mantiene como una estructura delimitada; el núcleo se encuentra encogido y oscuro, con la membrana fragmentada y con un agrupamiento anormal de la cromatina. La integridad nuclear es mantenida mas tiempo que la integridad citoplásmica. Las células son pálidas y pueden ser eosinofílicas, con apariencia de "fantasma". Este estadio generalmente sigue al de CCI, y depende de la localización del área cerebral y el tiempo de isquemia ( García, 1995 ).

### **3.- ANATOMIA DE CIRCULACION ARTERIAL DE CEREBRO DE GERBO**

La susceptibilidad en la respuesta al daño neurológico por ligadura bilateral de ACC se atribuye a una variante en la anastomosis de la circulación cerebral en gerbos (Levine y Payan, 1966). Los estudios histológicos realizados en 1969 por Levine y Sohn habían demostrado que no existe comunicación entre la circulación carotídea y la vertebro-basilar. Kenneth en 1972, demostró la ausencia de arterias comunicantes posteriores en la base del cerebro después de realizar inyección de látex en el sistema arterial. Harrison (1975) en 10 especímenes examinados reportó que en ninguno existía arteria comunicante posterior. Levy en 1974, describió que la arteria basilar comunicaba con la circulación carotídea en 6 especímenes a través de las arterias cerebelosas superiores o de otros vasos de 30-60  $\mu\text{m}$  de diámetro que cruzaban rostralmente la superficie

ventral del mesencéfalo hacia el hipotálamo, uniéndose algunos de estos vasos a la arteria cerebral posterior. En un estudio realizado recientemente (Castro, 2001 ) en 26 gerbos con oclusión y corte bilateral de ACC se logró el paso del material inyectado vía intracardiaca a la circulación anterior por medio de pequeñas arterias, con diámetro entre 8.95  $\mu\text{m}$  y 11.35  $\mu\text{m}$ , en el 30% de los animales evaluados, lo que confirma la variación anatómica de la circulación cerebral en este modelo.

En general, las arterias carótidas comunes en los roedores, se originan del arco aórtico en el lado izquierdo y a nivel del tronco braquiocefálico en el lado derecho. Se dividen a nivel del borde inferior de la glándula tiroidea en arteria carótida externa e interna. Las arterias vertebrales se originan de arterias subclavias, entran al agujero de la sexta vértebra cervical y corren por el canal transverso. La arteria basilar resulta de la fusión de dos arterias vertebrales y corre ventral a la superficie del tallo cerebral y provee de riego sanguíneo al tallo cerebral y cerebelo. La arteria cerebelosa superior es parte de la arborización terminal de la arteria basilar.

En estos animales, la arteria cerebral posterior se origina en la arteria carótida interna y el nombre de arteria comunicante posterior se aplica a la conexión que existe entre la arteria cerebral posterior y la arteria basilar o la arteria cerebelosa superior. En la rata, la arteria cerebral posterior termina en un número variable de ramas que entran en una red de anastomosis, la cual se encuentra dorsal a la superficie del colículo superior e inferior (Scremin, 1995 ); mientras que en el gerbo no existen estas conexiones ya que la arteria comunicante posterior es una variante que ha sido descrita por algunos autores (Matsuyama, 1983; Kusumoto, 1995 ) y en algunos estudios, se ha encontrado presente solamente en edades menores a 5 semanas (Figura 1).

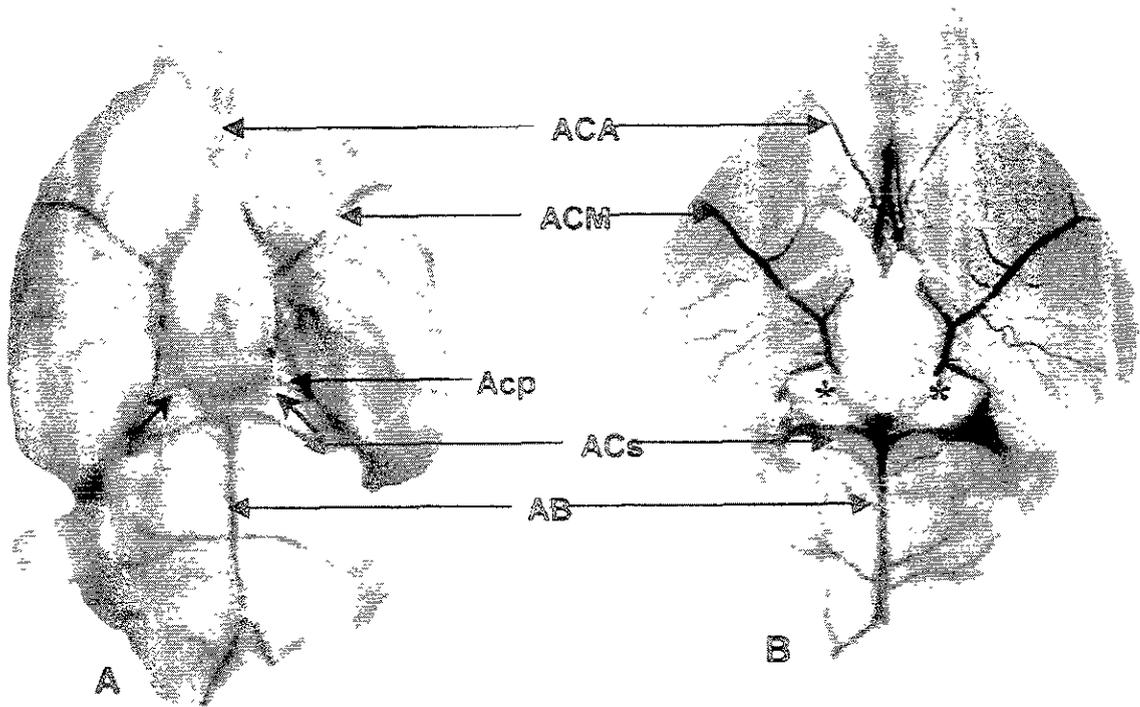


FIGURA 1.- Encéfalos con perfusión intracardiaca con formaldehído al 4% e inyección de tinta.

1A.- Fotografía de cerebro de rata (*Sprague Dawley*) con círculo arterial cerebral completo, donde se observa presencia de arterias comunicantes posteriores ( flechas )

1B.- Fotografía de cerebro de gerbo (*Meriones unguiculatus*) con ausencia de arterias comunicantes posteriores ( asteriscos ).

AB: ARTERIA BASILAR

AcS: ARTERIA CEREBELOSA SUPERIOR

Acp: ARTERIA COMUNICANTE POSTERIOR

ACM: ARTERIA CEREBRAL MEDIA

ACA: ARTERIA CEREBRAL ANTERIOR

#### 4.- ANATOMIA Y FISILOGIA DEL HIPOCAMPO

La formación hipocampal es un componente anatómico y funcional importante del SNC. La información concerniente a su organización celular y a sus conexiones intrínsecas se origina de los estudios clásicos de Ramón y Cajal en 1911 y Lorente de Nó en 1933, 1934 (Amaral, 1995 ).

El término formación hipocampal comprende seis distintas regiones citoarquitectónicas, incluyendo el giro dentado, hipocampo o Asta de Ammon, *subiculum*, *presubiculum*, *parasubiculum*, y corteza entorrinal, la cual contiene dos o más subdivisiones. El *subiculum*, *presubiculum* y *parasubiculum* se pueden agrupar como complejo subicular. El hipocampo también puede ser dividido en dos regiones principales: una grande proximal y una pequeña distal. Ramon y Cajal llamó a estas dos regiones región inferior y superior respectivamente. La terminología de Lorente de Nó, utilizada más comúnmente con la abreviatura CA (*Cornu Ammonis*), para dividir al hipocampo en cuatro áreas basado en su arquitectura citológica y conexiones sinápticas, denominadas: CA3, CA2 y CA1, siendo CA3 y CA2 equivalentes a la región inferior y CA1 a la región superior. Debido a las diferencias en la organización dendrítica de las células piramidales en diferentes partes de CA1 y CA3, Lorente de Nó utilizó subdivisiones para estos campos en tres subáreas cada uno (CA3a, b; CA1a,b,c ) (Amaral, 1995 ).

La posición tridimensional de la formación hipocampal en el cerebro de rata es complejo, aparece como una estructura grande y elongada, con su eje mayor extendiéndose en forma de C ( Figura 2A ). Posee una corteza trilaminar a nivel del giro dentado y del Asta de Ammon, pero en el *subiculum* hay una zona transicional hacia la corteza neopialial de seis capas. En el Asta de Ammon se consideran los siguientes

estratos a partir de la superficie ventricular: el *alveus*, por donde cursan fibras aferentes que llegan al hipocampo de otras regiones, y eferentes que parten del mismo (axones de células piramidales del hipocampo); el *estrato oriens* donde además de fibras aferentes y eferentes, se hallan células en canasta y otras pequeñas células de forma variada cuyos axones se dirigen en su mayoría a los estratos más profundos; el estrato de células piramidales, que da origen a dendritas basales que se distribuyen horizontalmente por el *estrato oriens* y a una dendrita apical que se ramifica en los estratos radiado y molecular situado más profundamente. De la base del soma parte el axón que después de cursar por el *estrato oriens* y el *alveus* pasa a la fimbria y posteriormente al *fornix* que constituye la principal vía eferente del hipocampo; los axones de las células piramidales dan ramas colaterales (colaterales de Schaeffer), que penetran al estrato lacunoso-molecular donde hacen sinapsis con las dendritas apicales de otras células piramidales; el estrato radiado sigue a continuación, en donde se arborizan las dendritas apicales de las células piramidales; finalmente, el estrato lacunoso-molecular que es el más profundo, contiene las ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las células piramidales, interneuronas diseminadas y fibras que llegan al hipocampo ( Scremin, 1995 ).

La fascia dentada o giro dentado tiene una estructura trilaminar, constituida por las capas molecular o superficial, granular intermedia y polimórfica profunda. Contiene neuronas de axón corto ( Golgi tipo II), cuyos axones y dendritas se distribuyen dentro de la capa en que están situadas. Algunas células de la capa piramidal 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; se les llama fibras musgosas

por la gran cantidad de varicosidades que presentan. Otros axones de las células de la capa granular llegan hasta el *alveus* para incorporarse posteriormente a la fimbria.

El *subículo* se continua lateralmente con la corteza del área entorrinal. Tiene una estructura que representa la transición de una corteza trilaminar en el hipocampo a una disposición en seis capas en el área entorrinal, por lo que se le consideran varias partes: parasubículo (contiguo a la corteza entorrinal), presubículo, subículo y prosubículo este último separado del giro dentado por la cisura hipocámpal.

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. 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 que llegan al estrato lacunoso-molecular provienen de la corteza entorrinal del lado opuesto y alcanzan al hipocampo pasando por la comisura hipocámpal, las que terminan en el *alveus* y en el estrato oriens proceden del área entorrinal del mismo lado.

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 (Figura 2B).

Las complejas relaciones anatómicas del hipocampo sugieren que interviene en variadas funciones en las que participan diferentes niveles neuronales. Ha sido implicado en funciones sensoriales, en la conducta emocional, en la regulación visceral y endocrina, en los procesos de condicionamiento y aprendizaje y en la organización de la memoria (Amaral, 1995; Fernández, 1996 ; Giap, 2000).

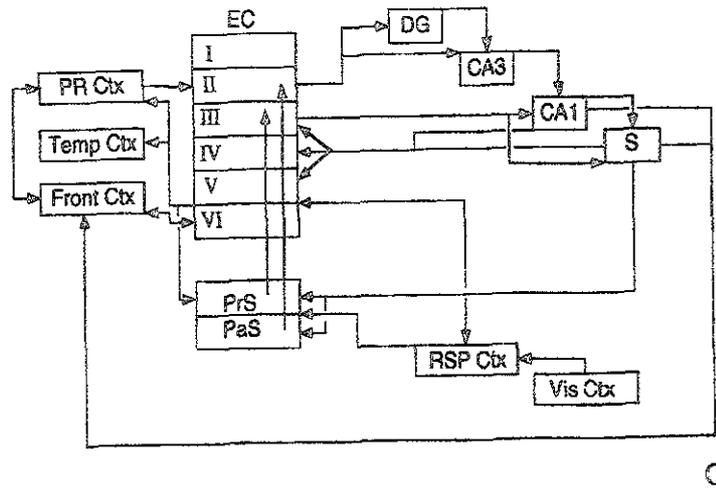
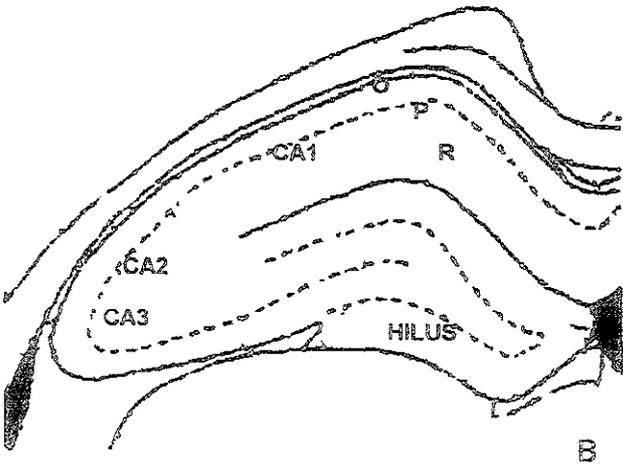
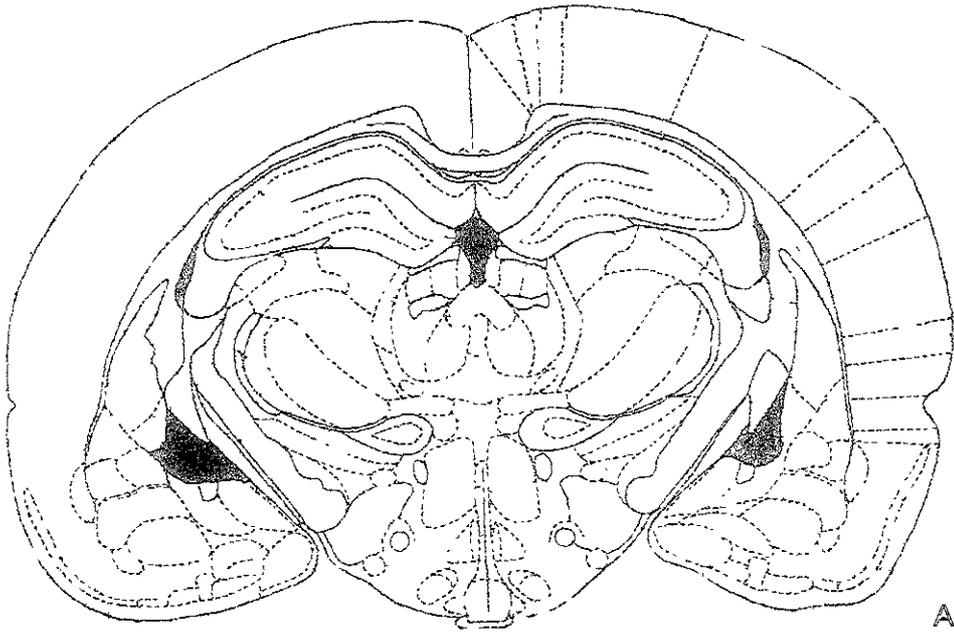


Figura 2.-

2A.- Nivel de corte coronal de cerebro para localización de hipocampo dorsal

2B.- Hipocampo dorsal derecho

2C.- Proyecciones hipocampales.

## 5.- CONDICIONES PARA LA EVALUACION FARMACOLOGICA EN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA - REPERFUSION EN GERBOS.

Para evaluar el daño neuronal por isquemia cerebral inducida experimentalmente y los efectos farmacológicos para disminuirlo o evitarlo, deben considerarse diferentes variables como el manejo del gerbo durante la inducción anestésica, durante la cirugía y durante el período postoperatorio, además de la elección del anestésico, tiempo de isquemia, método de oclusión arterial, empleo de fármacos y dosis, al igual que las vías de administración, la concentración de oxígeno inspirada, la temperatura del cuarto de trabajo, el estado nutricional y la temperatura corporal del espécimen, etc. (Clifton, 1989).

Las variables que intervienen en el período de administración del fármaco son principalmente: tiempo de viabilidad del tejido, duración del daño de isquemia ( min/h ), reperfusión espontánea, estado de la microcirculación, daños secundarios potenciales, mecanismo farmacológico de acción del tratamiento, vida media farmacocinética, y vida media biológica (Ginsberg, 1989).

Además, la neuroprotección involucra evidencia de beneficio en daños histológicos agudos y crónicos, eficacia en especies girencefálicas, y en modelos de reperfusión. (Dorman, 1996). También debe considerarse que se requiere un modelo animal en el cual: a)-una arteria pueda ser ocluida de manera reproducible, b)-la oclusión vascular resulte en cambios predecibles del flujo sanguíneo (isquemia focal o regional), c)-el método de oclusión arterial pueda ser compatible con reperfusión subsecuente del territorio de isquemia.

Es necesaria también, la consideración de la edad para los estudios en modelos de isquemia con gerbos, ya que algunos autores ( Matsuyama, 1983;. Kusumoto, 1995 ),

han descrito que existe una mayor tolerancia para periodos largos de isquemia, en gerbos menores a 5 semanas de edad, debido a que presentan vasos que comunican la circulación anterior y posterior, los cuales, en edades posteriores ya no son eficientes o no existen.

### 5.1.- BASES DE LA NEUROPROTECCION

Los estudios experimentales en animales han proporcionado una detallada descripción de los cambios que se producen en la morfología neuronal, el FSC y el metabolismo cerebral durante y después de la isquemia cerebral (Crockard, 1980; Astrup, 1982; Hass, 1983; Bereckzi, 1988).

Restablecer el FSC no es suficiente para detener la cascada lesiva producida por isquemia, a no ser que se realice de manera casi inmediata, debido a que la reperfusión se asocia a una serie de fenómenos nocivos que también deben neutralizarse para obtener el máximo beneficio. Así, es importante el establecimiento de un tratamiento oportuno para la inhibición farmacológica de los mediadores del daño por isquemia-reperfusión ( Diez-Tejedor, 1996; Planas, 1997; Basile, 1999; Brott, 2000; Clemens, 2000; Gozes, 2000; Lees, 2000; Chua, 2001).

El intervalo de tiempo durante el cual un fármaco neuroprotector puede reducir o impedir la lesión cerebral se denomina "ventana neuroprotectora" (Pulsinelli, 1995)

La estrategia terapéutica debe ser multifactorial, y combinar los siguientes aspectos:

1. - Factor tiempo. Inicio precoz del tratamiento ( Pulsinelli, 1995).
2. - Aumento del FSC. ( Matias-Guiu, 1988 ).
3. -Bloqueo de la cascada isquémica. Actualmente, se esta prestando gran atención a la posibilidad de actuar sobre las alteraciones bioquímicas postisquémicas como la salida

de  $K^+$  de la célula, entrada de  $Ca^{2+}$ , acumulo de ácido láctico, formación de radicales libres, disminución en la producción de ATP, etc. ( Ginsberg, 1995a, 1995b; Brott, 2000; Gagliardi, 2000; Chua, 2001).

Como consecuencia de lo anterior surgió el concepto de neuroprotección, definido como el bloqueo de estas alteraciones para evitar o retrasar la evolución de la muerte celular (Matias-Guiu, 1988).

Las distintas sustancias propuestas como neuroprotectoras, sus probables mecanismos de acción, su efecto en distintos modelos experimentales y su utilidad clínica han sido objeto de numerosas revisiones ( Siesjö, 1991; Ginsberg, 1995a; Ginsberg, 1995b; Michaleck, 1997; Zivin, 1997; Goldszmidt, 1998; Hickenbottom, 1998; Davis, 1999; Devuyst, 1999; Richardson, 1999; Martinez-Vila 1995, 1996, 1999, 2001; Lee, 2000 ).

Las principales orientaciones terapéuticas en neuroprotección en isquemia cerebral y las investigaciones con fármacos neuroprotectores se resumen en la Tabla 1 (Lee, 2000).

### *Antagonistas del receptor N-metil D-aspartato (NMDA)*

Los canales de calcio regulados a través de receptores son canales rápidos y están activados fundamentalmente por glutamato. El complejo NMDA es un canal de calcio regulado por receptor que contiene moduladores, que son los lugares de la glicina y la poliamina. (Martinez-Vila, 1999). Los fármacos con acción antagonista de los receptores NMDA pueden ser competitivos o no competitivos.

### *Acción sobre los canales de calcio*

Se ha demostrado que la alteración en la homeostasis de los iones  $Ca^{2+}$  constituye uno de los factores deletéreos más importantes entre los procesos bioquímicos que llevan a la muerte celular ( Melvin, 1990; Asano, 1991 ).

### *Acción de los aminoácidos excitatorios sobre la toxicidad.*

En la última década el papel de los AEE en la patogenia de la muerte neuronal por isquemia cerebral focal o global ha adquirido un interés creciente. Esta idea ha sido corroborada por la demostración de que antagonizando la transmisión de los AEE se reduce el daño cerebral (Ginsberg, 1995a; Choi, 1990 ).

De los distintos receptores postsinápticos de glutamato, el mejor caracterizado es el receptor NMDA, que regula la entrada de los iones calcio y sodio en la célula, y cuyo papel en la excitotoxicidad es crucial (Ginsberg, 1995b; Lipton, 1994 ). Los receptores AMPA y KA (receptores no-NMDA), aunque menos estudiados parecen tener también una función importante en la neuroprotección, de esta manera las posibilidades de intervención farmacológica en los receptores ionotrópicos del glutamato son numerosas ( Albers, 1989 ).

### *Antagonistas NMDA no competitivos*

El magnesio en dosis altas actúa como vasodilatador endógeno de la circulación cerebral y se comporta farmacológicamente como un antagonista no competitivo de los receptores NMDA. Su efecto neuroprotector se ha demostrado en distintos modelos experimentales de isquemia cerebral ( Miur, 1995 ).

### *Antioxidantes. Antagonistas de radicales libres.*

La presencia de radicales libres parece representar uno de los factores más importantes de la lesión cerebral durante la reperfusión post-isquémica. Los radicales libres como el hidroxilo (el más reactivo y tóxico de estas moléculas), el peróxido de hidrógeno o el superóxido contienen un electrón no apareado en su última órbita y pueden originar la oxidación de diversos constituyentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Schmidley, 1990; Siesjö, 1989 ). La peroxidación de las membranas lipídicas

parece ser el mecanismo primario a través del cual los radicales libres lesionan el tejido cerebral.

Agentes terapéuticos que intervienen en uno o más puntos de las cascadas fisiopatológicas iniciadas por isquemia y reperfusión, han sido bien identificados y otros se encuentran en evaluación preclínica y clínica (Fisher, 1994a, 1994b).

TABLA 1. AGENTES TERAPEUTICOS EVALUADOS EN ISQUEMIA CEREBRAL.  
LEE J M (2000) *J CLIN INVEST* 106(6) 723-731

CATEGORIA DEL FÁRMACO	NOMBRE	MECANISMO DE ACCION
ANTAGONISTAS DE GLUTAMATO	YM872 ZK-200775 (MPQX) CGS 197SS(SELFOTEL)	ANTAGONISTA AMPA BLOQUEADOR COMPETITIVO NMDA
AGONISTAS GABA	APTIGANEL(CERESTAT) DXTROFAN DXTROMETORFAN MAGNESIO NPS 1506 REMACEMIDA ACEA 1021 (LICOSTINEL) GV 150526 SL 82-0715(ELIPRODIL) CLOMETIAZOLE (ZENDRA)	ANTAGONISTA GLICINA ANTAGONISTA POLIAMINA EXCITACION ▽ GLUTAMATO ▽ GLUTAMATO ▽ GLUTAMATO
ANTAGONISTAS OPIACEOS AGONISTAS SEROTONINA ANTAGONISTAS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE AGONISTA DE CANALES K <sup>+</sup> DEPENDIENTES DE VOLTAJE ANTAGONISTA CANALES Na <sup>+</sup>	NALMEFEME (CERVENE) BAY X 3702 (REPINOTAN)  NIMODIPINO (NIMOTOP) FLUNARIZINA (SIBELIUM) BMS-204352 FOSFENITOINA (CEREBRYX) BW619C89	▽ FLUJO DE Ca <sup>2+</sup> FLUJO DE Ca <sup>2+</sup> ▽ EXCITABILIDAD GLUTAMATO Y ▽ RADICALES LIBRES
ATRAPADORES DE RADICALES	MESILATO DE TIRILAZAD EBSELEN CITICOLINA(CERAXON)	ESTABILIZADOR DE MEMBRANA ANTIAPOPTOSIS ? LEUCOTROFISMO
PRECURSOR DE FOSFATIDILCOLINA FACTORES DE CRECIMIENTO INHIBIDOR DE ADHESION LEUCOCITOS DESCONOCIDOS	FACTOR CRECIMIENTO FIBROBLASTO ANTICUERPOS ANTI-ICAM HU23F2G LUBELUZOL	▽ GLUTAMATO, OXIDO NITRICO

## 5.2.- NEUROPROTECCION PROFILACTICA.

El concepto de neuroprotección profiláctica deriva de los resultados de animales evaluados en modelos de isquemia. Las terapias neuroprotectoras actúan directamente sobre los efectos celulares, bioquímicos y metabólicos del daño producido por isquemia, al disminuir el tiempo entre la administración de agentes neuroprotectores y el evento de isquemia en el tejido cerebral ( Cottrell, 1995, Dorman, 1996 ), por lo que el mejor intervalo de tiempo debe ser cero: esto es la neuroprotección profiláctica. ( Jonas, 1995).

Los fármacos y sus posibles asociaciones pueden incluir desde los antagonistas de calcio y antagonistas de radicales libres, hasta los antagonistas de los receptores NMDA o de los receptores AMPA y los moduladores de los canales del sodio, entre otros potenciales agentes neuroprotectores. Con ello se lograría un inicio ultra precoz del tratamiento neuroprotector ( Martinez-Vila, 1995; 1996; 1998 ).

## 5.3.-ASOCIACION DE FARMACOS

Debido a que son numerosos los mecanismos involucrados en el proceso isquémico, parece improbable que un solo fármaco pueda tener un efecto neuroprotector máximo y definitivo, por lo que es razonable suponer que la combinación de varios fármacos puede ejercer efectos sinérgicos al bloquear vías metabólicas diferentes.

En modelos experimentales de isquemia cerebral se han publicado resultados beneficios con distintas asociaciones de fármacos y medidas neuroprotectoras: antagonista NMDA y calcio antagonistas, antagonistas no-NMDA y antagonistas NMDA, antagonistas NMDA y agonista GABA-A, antagonista NMDA y antagonista de receptores D1, antagonista NMDA e hipotermia, además de otras orientaciones farmacológicas que

conjugan dos o más acciones neuroprotectoras como antioxidantes y antagonista no competitivo NMDA, calcio antagonistas y antioxidantes, calcio antagonista y antagonista de la serotonina (Ginsberg, 1995).

## **6.- FARMACOCINETICA DE NEUROPROTECTORES**

### **6.1.- ETOMIDATO**

El etomidato, 1-(1-feniletil)-1H-imidazol-5-ácido carboxílico etil ester, es un potente hipnótico barbitúrico de acción corta, con propiedades anticonvulsivas. Algunos de los mecanismos por los cuales el etomidato reduce el daño por isquemia pueden estar relacionado con su habilidad para reducir el consumo metabólico promedio de oxígeno (35-50%) (Frizzell, 1991; Batjer, 1993; Hoffman, 1997; Levy, 1998), lo que sugiere que esta reducción incrementa la tolerancia de las neuronas a la isquemia. Además, el etomidato disminuye la liberación de aminoácidos excitatorios en el hipocampo (Smith, 1989), pero no en corteza cerebral (Patel, 1995), y atenúa la pérdida de metabolitos de alta energía y la acumulación de lactato durante la hipotensión oligohémica en perros y también durante la isquemia cerebral e hipoxemia en ratas. (Milde, 1986; Smith, 1989; Frizzell, 1991). Otros efectos sobre la cascada bioquímica isquémica son por bloqueo de los canales de sodio (Frenkel, 1998) y potasio (Friederich, 1997).

Por este motivo, el etomidato ha sido descrito y evaluado como agente neuroprotector (Mantz, 1999; Hans, 2000; Warner, 2000).

Estudios realizados en modelos de isquemia focal en ratas (Sano, 1993), concluyen que el etomidato administrado previo al evento isquémico reduce el daño a estructuras cerebrales.

En gerbos se ha evaluado de manera terapéutica la sobrevida y el daño neurológico de manera comparativa con éter, tiopental y etomidato, en un modelo con y sin ligadura bilateral de arterias carótidas ( Hermans 1983 ).

El inicio de acción de su efecto es de 1 minuto después de la administración intravenosa la duración de su efecto corresponde a 3-10 minutos y su período de latencia es de 30-60 segundos (Levron, 1990; Polis, 1997). Las dosis de etomidato descrita en la literatura (Smith, 1989; Frizzell, 1991, Koorn, 1994; Patel, 1995 ) de  $0.6 \text{ mg/kg}^{-1}$  corresponde a la óptima para los efectos neuroprotectores evaluados.

## 6.2.- SULFATO DE MAGNESIO

El magnesio es un catión muy importante en el organismo. Es esencial en la integridad de la membrana y en la producción y función de ATP, así como en la formación y síntesis de ATPasa, de cofactores como la CoA y pirofosfato de tiamina, además de que regula la glicolisis del ciclo de Krebs. Actúa como cofactor fisiológico en la bomba sodio-potasio de la membrana de las células musculares. Deprime el SNC al inhibir la liberación de acetilcolina y bloquear la transmisión neuromuscular periférica. Posee además un leve efecto diurético y vasodilatador. *In vitro* protege del daño anóxico porque inhibe la liberación de neurotransmisores por bloqueo de la transmisión sináptica ( Kass, y cols. 1988; Marinov, y cols.1996; Mcinstosh, y cols. 1989).

Sus efectos citoprotectores, de manera dosis dependiente, han sido comprobados por diversos estudios ( Vink, 1990; Muir, 1995; Marinov, y cols. 1996; Heath; 1997; Muir, 1998a; Muir, 1998b; Heath 1998; Sirin, 1998; Heath, 1999a; Heath, 1999b; Lang, 2000 ; Yangn, 2000 ) donde se ha demostrado los beneficios de la administración sistémica de magnesio en modelos experimentales de isquemia cerebral focal, isquemia de médula

espinal y daño traumático cerebral. Nishiki y cols. (1995) administró sulfato de magnesio via intraperitoneal previo a un evento de isquemia experimental global en ratas, y demostró que el magnesio es un potente neuroprotector *in vivo* lo que comprueba que existe un transporte activo de magnesio dentro del cerebro después de su administración sistémica; en gerbos no ha sido evaluado como neuroprotector. Aportaciones de Sjoström y Wester (1994) confirman que tal transporte ocurre, sin embargo, muchos de los mecanismos subyacentes de citoprotección que bloquean canales e inhiben la liberación de aminoácidos excitatorios en la isquemia focal, aún no han sido descritos completamente. Los mecanismos de acción del sulfato de magnesio involucran principalmente: bloqueo de receptores NMDA; bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje; inhibición de la peroxidación lipídica, inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios y vasodilatación cerebral (Hoffman, 1994; Hallak y cols. 1996; Marinov y cols. 1996; Chahal y cols. 1998; Hallak, 1998; Suzer, 1999 ). Después de su administración parenteral, el inicio de su acción es casi inmediato, siendo efectivo durante 30 minutos. En ratas, la dosis de neuroprotección de sulfato de magnesio es de 30 mg/kg ( Heath, y Vink 1997; McIntosh y cols. 1989).

### 6.3.- METILPREDNISOLONA

La metilprednisolona es un glucocorticoide sintético que se utilizó inicialmente por su actividad antiinflamatoria y la disminución de la actividad mineralocorticoide. Produce una modificación a nivel enzimático, inhibiendo los fenómenos inflamatorios tisulares: dilatación capilar, edema, migración de leucocitos, etc. Antagoniza la histamina y la liberación de quininas. Suprime parte de la respuesta inmunitaria al producir linfopenia,

disminución de inmunoglobulinas, de complemento, y del volumen y actividad del sistema linfático (McGraw, 1974; Hall, 1992) .

Es un atrapador de radicales libres de oxígeno, transformándolos en oxígeno molecular. Inhibe la peroxidación lipídica, la lipólisis y mantiene el flujo sanguíneo tisular, inhibe la acumulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , la excitabilidad y transmisión sináptica neuronales. En estudios *ex vivo* preserva la actividad  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa y AMPc (Hall, 1992). Se ha demostrado selectividad de la metilprednisolona en las neuronas de la región CA1 del hipocampo (Braugher, y Mark 1985; Chen, 1996). Sus mecanismos de acción son principalmente: inhibición de peroxidación lipídica; inhibición de hidrólisis lipídica y formación de eicosanoides; mantenimiento del flujo sanguíneo tisular; mantenimiento de metabolismo energético aeróbico; disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; mejoría de la excitabilidad neuronal y de la transmisión sináptica, por preservación de la función de la bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa (Palmer, 1985, Hall, 1992, ).

Las dosis aceptadas para terapias neuroprotectoras, evaluadas en diversas especies corresponden a 15-30 mg/kg (Braugher, y Mark 1985, Hall, 1992). La vida media plasmática corresponde a 2.4 - 3.3 horas después de su administración; la vida media biológica es de 12 a 36 horas. Entre 40 y 60% de metilprednisolona se une a proteínas plasmáticas (Hall, 1992). Su efecto máximo ocurre a los 30 minutos de su administración y su acción es dosis dependiente ( Bracken, 1984; Braugher, 1985; Braugher, 1986; Short, 2000 ).

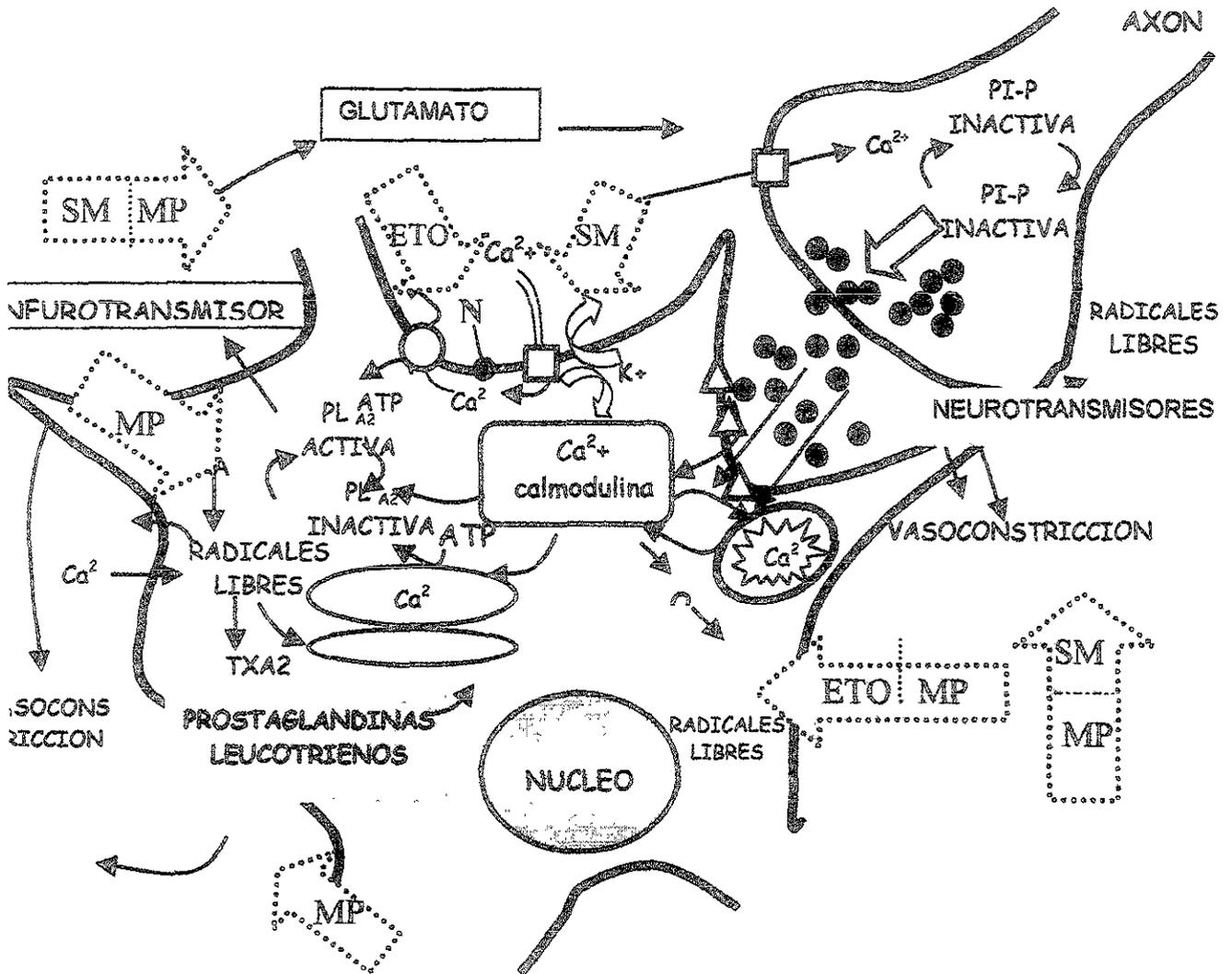


Figura 3.- MECANISMOS DE ACCION DE NEUROPROTECTORES

Las principales acciones neuroprotectoras de los fármacos evaluados corresponden a antagonizar los efectos deletéreos iniciados por la isquemia y potenciados por la resperfusión, como la entrada masiva de calcio a la célula al bloquear los canales del receptor NMDA y mantener el potencial de membrana en el caso del sulfato de magnesio; metilprednisolona tiene importantes acciones en el mantenimiento de la permeabilidad de membrana e inhibición de la peroxidación lípida, y el etomidato actúa principalmente como bloqueador de canales de sodio y antagonismo de la liberación de AAE y particularmente atenúa el metabolismo anaerobio al reducir el consumo metabólico de oxígeno de las neuronas y la pérdida de metabolitos de alta energía.

conjugan dos o más acciones neuroprotectoras como antioxidantes y antagonista no competitivo NMDA, calcio antagonistas y antioxidantes, calcio antagonista y antagonista de la serotonina (Ginsberg, 1995).

## 6.- FARMACOCINETICA DE NEUROPROTECTORES

### 6.1.- ETOMIDATO

El etomidato, 1-(1-feniletil)-1H-imidazol-5- ácido carboxílico etil ester, es un potente hipnótico barbitúrico de acción corta, con propiedades anticonvulsivas. Algunos de los mecanismos por los cuales el etomidato reduce el daño por isquemia pueden estar relacionado con su habilidad para reducir el consumo metabólico promedio de oxígeno (35-50%) (Frizzell, 1991; Batjer, 1993; Hoffman, 1997; Levy, 1998 ), lo que sugiere que esta reducción incrementa la tolerancia de las neuronas a la isquemia. Además, el etomidato disminuye la liberación de aminoácidos excitatorios en el hipocampo ( Smith, 1989), pero no en corteza cerebral (Patel, 1995), y atenúa la pérdida de metabolitos de alta energía y la acumulación de lactato durante la hipotensión oligohémica en perros y también durante la isquemia cerebral e hipoxemia en ratas. ( Milde, 1986; Smith, 1989; Frizzell, 1991 ). Otros efectos sobre la cascada bioquímica isquémica son por bloqueo de los canales de sodio ( Frenkel, 1998 ) y potasio ( Friederich, 1997 ).

Por este motivo, el etomidato ha sido descrito y evaluado como agente neuroprotector (Mantz, 1999; Hans, 2000; Warner, 2000 ).

Estudios realizados en modelos de isquemia focal en ratas ( Sano, 1993 ), concluyen que el etomidato administrado previo al evento isquémico reduce el daño a estructuras cerebrales.

## **7.- JUSTIFICACION**

Los fármacos neuroprotectores investigados actualmente en monoterapias intervienen sólo en algunas etapas de la cascada isquémica, lo cual no es suficiente para proteger al sujeto con compromiso vascular-cerebral y disminuir la presentación de secuelas por daño al tejido nervioso. Es posible que la asociación de algunos de estos agentes con mecanismos de acción diferentes, puedan tener actividad sinérgica, por lo que la exploración de esta posibilidad en modelos experimentales de isquemia-reperusión debe realizarse.

## **8.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿ La administración de un tratamiento profiláctico con asociación de etomidato, sulfato de magnesio y metilprednisolona en un modelo de isquemia-reperusión preservará un mayor número de neuronas de la capa piramidal de las áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal que la administración aislada?

## **7.- JUSTIFICACION**

Los fármacos neuroprotectores investigados actualmente en monoterapias intervienen sólo en algunas etapas de la cascada isquémica, lo cual no es suficiente para proteger al sujeto con compromiso vascular-cerebral y disminuir la presentación de secuelas por daño al tejido nervioso. Es posible que la asociación de algunos de estos agentes con mecanismos de acción diferentes, puedan tener actividad sinérgica, por lo que la exploración de esta posibilidad en modelos experimentales de isquemia-reperusión debe realizarse.

## **8.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿ La administración de un tratamiento profiláctico con asociación de etomidato, sulfato de magnesio y metilprednisolona en un modelo de isquemia-reperusión preservará un mayor número de neuronas de la capa piramidal de las áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal que la administración aislada?

## **9.- HIPOTESIS**

1- Durante la lesión al tejido nervioso por isquemia y reperfusión se activan una serie de eventos que favorecen la excitotoxicidad y la formación de especies reactivas de oxígeno, algunos de los cuales pueden ser bloqueados por diversos fármacos.

Si la administración profiláctica de etomidato, sulfato de magnesio y metilprednisolona en un esquema terapéutico aislado inhibe diversos pasos de la cascada isquémica, entonces:

La administración asociada de estos fármacos preservará un mayor número de neuronas piramidales en las áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de gerbos sometidos a isquemia y reperfusión que la administración aislada.

## **10.- OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y comparar el tratamiento profiláctico con sulfato de magnesio, etomidato y metilprednisolona sobre el número de neuronas piramidales viables en áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de gerbos sometidos a isquemia - reperfusión.

## **9.- HIPOTESIS**

1- Durante la lesión al tejido nervioso por isquemia y reperfusión se activan una serie de eventos que favorecen la excitotoxicidad y la formación de especies reactivas de oxígeno, algunos de los cuales pueden ser bloqueados por diversos fármacos.

Si la administración profiláctica de etomidato, sulfato de magnesio y metilprednisolona en un esquema terapéutico aislado inhibe diversos pasos de la cascada isquémica, entonces:

La administración asociada de estos fármacos preservará un mayor número de neuronas piramidales en las áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de gerbos sometidos a isquemia y reperfusión que la administración aislada.

## **10.- OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y comparar el tratamiento profiláctico con sulfato de magnesio, etomidato y metilprednisolona sobre el número de neuronas piramidales viables en áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de gerbos sometidos a isquemia - reperfusión.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Cuantificar el número de neuronas piramidales viables de las áreas CA1 y CA3 en hipocampo dorsal de gerbos de grupo testigo negativo (sin manipulación quirúrgica); testigo positivo ( con isquemia - reperfusión sin tratamiento profiláctico) y de grupo sham ( procedimiento quirúrgico simulado ) en un modelo de isquemia – reperfusión.
2. Cuantificar el número de neuronas piramidales viables de las áreas CA1 y CA3 en hipocampo dorsal de gerbos sometidos a un tratamiento profiláctico con etomidato, metilprednisolona y sulfato de magnesio en un modelo de isquemia – reperfusión.
3. Cuantificar el número de neuronas piramidales viables de las áreas CA1 y CA3 en hipocampo dorsal de gerbos sometidos a un tratamiento profiláctico con etomidato y sulfato de magnesio; etomidato y metilprednisolona; metilprednisolona y sulfato de magnesio en un modelo de isquemia - reperfusión.

## 11.- MATERIAL Y METODO

### 11.1.- POBLACION Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

POBLACION OBJETIVO: Gerbos *Meriones unguiculatus*

MUESTRA: Gerbos machos adultos de 70-80 g .

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Se utilizaron un total de 56 gerbos: 7 para el grupo control, 7 para el grupo sham y 7 para cada grupo experimental.

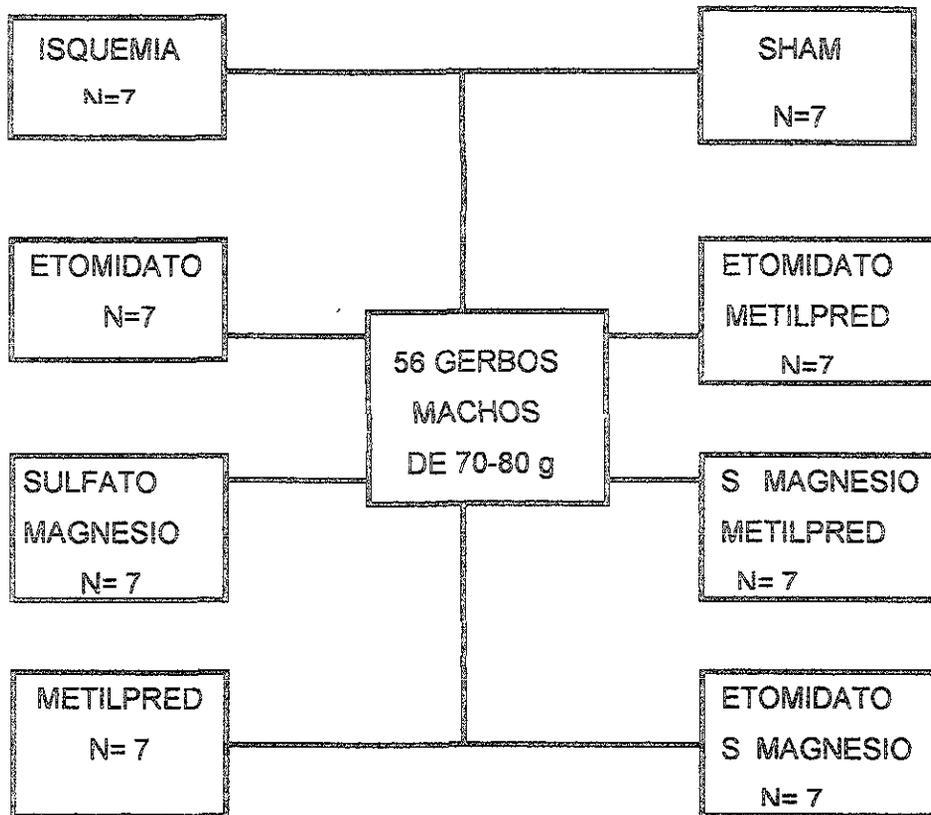
### 11.2.-CUIDADOS GENERALES

Los gerbos se ambientaron 2 semanas antes del procedimiento, en las mismas condiciones y libre acceso al agua y alimento.

### 11.3.- DISEÑO GENERAL

Los animales fueron sometidos a oclusión carotídea bilateral completa con clamps para aneurisma. Los fármacos en estudio se administraron de manera previa a la oclusión de las ACC, de acuerdo a los tiempos determinados. Todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones postoperatorias inmediatas y tardías (acceso a agua y alimento). El día de la oclusión carotídea se consideró el día cero del seguimiento. Durante el procedimiento, la temperatura corporal de los animales se mantuvo mediante un cojín eléctrico, en un rango de  $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$  C, posteriormente, se reguló con un sistema de iluminación eléctrica. Todos los animales fueron observados clínicamente hasta el día 7, cuando se sacrificaron para estudio morfológico ( ver esquema de distribución de grupos).

## ESQUEMA DE DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS



### 11.4.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

**INCLUSION:** Gerbos sometidos a isquemia experimental-reperfusión en quienes se logre:

- Verificación de la oclusión de arterias carótidas por visualización directa de ausencia de flujo sanguíneo al microscopio quirúrgico.
- Verificación adecuada de perfusión (arteria carótida común permeable con flujo sanguíneo evidente a través del microscopio).
- Sobrevida de 7 días

## 11.5.- PROCEDIMIENTOS

### 11.5.a- ADMINISTRACION DE FARMACOS:

Los fármacos diluidos en solución fisiológica ( 0.9% de NaCl ) se administraron por vía intraperitoneal, en dosis única, previa asepsia y antisepsia del área, mediante jeringa de insulina.

**METILPREDNISOLONA:** Liofilizado para solución inyectable. Succionato de metilprednisolona, equivalente a 500 mg de MP, vehículo 8 ml. Clave 476 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se administró 60 minutos previos al evento isquémico a dosis de 30 mg. / kg.

**SULFATO DE MAGNESIO** Solución inyectable 10 ml, sulfato de magnesio 1.0 gm, equivalente a magnesio 0.1 mEq, sulfato 0.1 mEq, agua inyectable c.b.p 10 ml. Clave 3629 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se administró 30 minutos previos a dosis de 30 mg / kg.

**ETOMIDATO:** Solución inyectable. Etomidato 20 g. ampolleta de 10 ml. Clave 243 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se administró 10 minutos previos a la cirugía a dosis de 0.6 mg / kg.

### 11.5.b. - OCLUSION DE ARTERIAS CAROTIDAS

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (25 mg/kg, i.p), y se colocaron en decúbito dorsal con hiperextensión del cuello. Posterior a la tricotomía, se realizó una incisión en la línea media, desde el manubrio esternal al promontorio piloso de la barbilla disecando las estructuras glandulares, para finalmente separar los elementos musculares que forman el triángulo carotídeo, e identificar la vaina que envuelve las arterias carótidas, y colocar clamp para aneurisma (40 g de presión) en

ambas arterias carótidas. Después de 20 minutos de isquemia, los clamps fueron retirados y la reperfusión se confirmó a través del microscopio. La herida quirúrgica fue suturada en dos planos con prolene 5-0 (Figura 4)

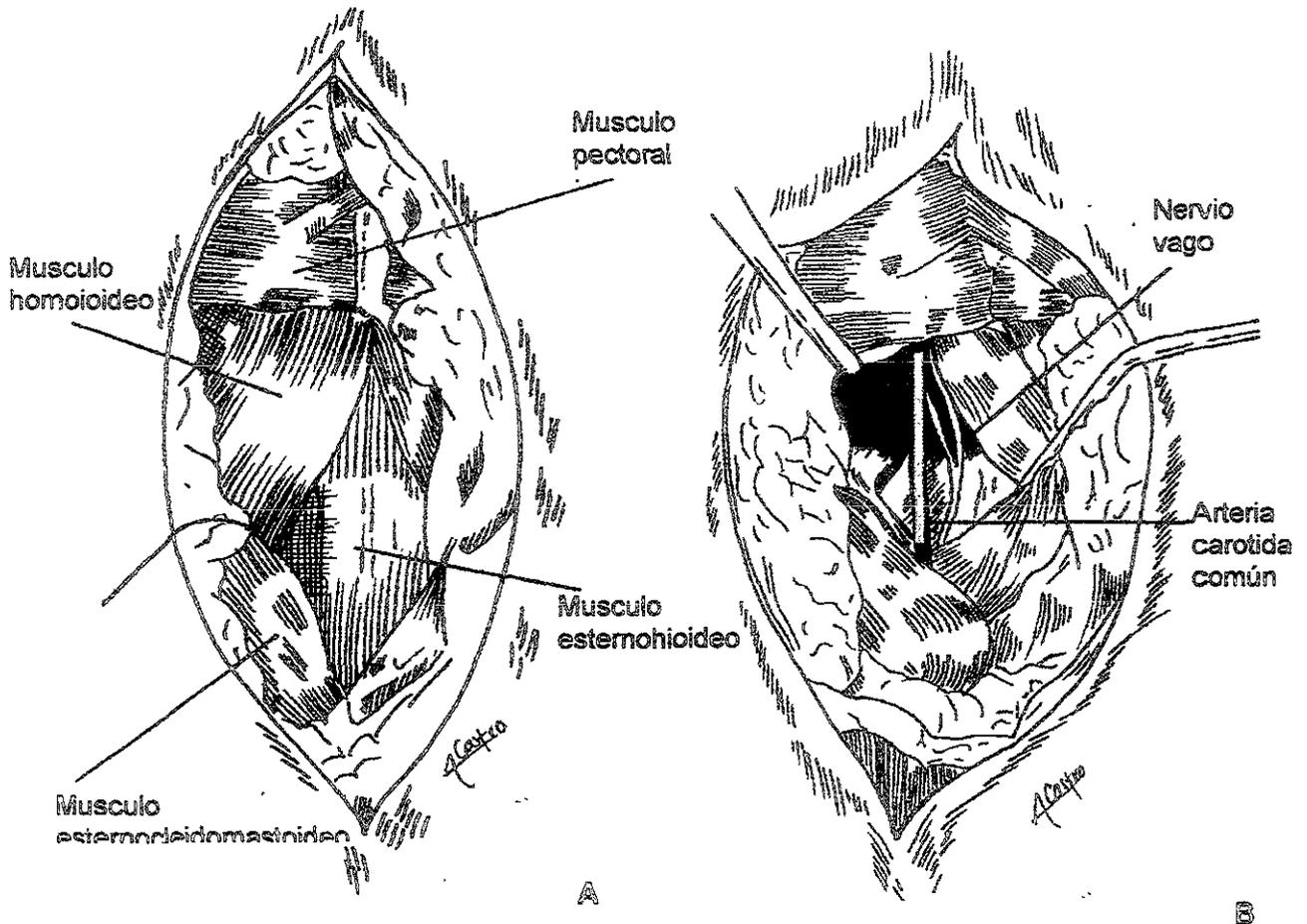


Figura 4.- Técnica de disección para oclusión de arterias carótidas comunes

- A.- Disección de estructuras glandulares, para separar los elementos musculares que forman el triángulo carotídeo.
- B.- Identificación de la vaina que envuelve las arterias carótidas para oclusión

### 11.5.c.- CUIDADOS POSOPERATORIOS

Los gerbos se mantuvieron en recuperación durante un período de 4 horas de observación clínica, o hasta que despertaran de la anestesia; todos los grupos recibieron el mismo tipo de alimentación y agua *ad libitum*, y cuidados generales, colocándose en cajas de piso sólido y tapa removible de reja con cama de aserrín estéril.

### 11.5.d.- OBTENCION DEL TEJIDO Y PREPARACIÓN HISTOLOGICA

Después de 7 días de sobrevivida, bajo anestesia con pentobarbital sódico (25 mg/kg, i.p), los gerbos se sometieron a perfusión intracardiaca mediante toracotomía y lavado infusión por ventrículo izquierdo (aún en actividad cardiaca ) con solución salina NaCl 0.9% (40 ml) durante 10 minutos, seguido de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos pH 7.4, 0.1 M (40 ml) durante 10 minutos para la fijación directa del tejido cerebral. Una vez obtenidos los cerebros, se fijaron en la misma solución de paraformaldehído durante siete días más. Subsecuentemente, los tejidos fueron sometidos al siguiente procedimiento ( Luna 1960 ):

- 1.- Deshidratación en alcoholes ascendentes ( alcohol etílico 70%, 80 %, 96% y alcohol absoluto, 30 minutos en cada uno ),
- 2.- Aclaración en dos baños de xileno ( media hora cada uno)
- 3.- Colocación en parafina histológica (MERCK) a 57° C durante 4 horas y posteriormente inclusión en moldes ( Paraflex ) dejándose enfriar a 4°C.

Los bloques conteniendo los cerebros fueron cortados paralelamente al plano coronal, en secciones de 20  $\mu$ m de espesor, con un microtomo rotor (American Optical Company) hasta localizar la zona de inicio de hipocampo dorsal ( Amaral, 1995 ), a

partir de ese momento, se realizaron cortes seriados de 9µm de espesor. Los cortes seleccionados se colocaron en un baño de flotación con agua a 45°C con 0.5 g de gelatina bacteriológica por cada litro, y después se colocaron sobre laminillas de vidrio convencionales para ser teñidas con violeta de cresilo (MERCK) mediante técnica de Nissl para su estudio morfométrico.

#### 11.5.e.- METODO DE NISSL ( PARA CORTES DE PARAFINA )

*Modificada por C. Avendaño (1999) Universidad Autónoma de Madrid. España.*

#### SOLUCION

Violeta de Cresilo (Merck) al 1% en agua

Alcohol adicionado de ácido acético:

60 cc. De alcohol de 96°

4 gotas de ácido acético

#### TECNICA

Desparafinar con xileno ( mínimo 15 minutos )

Paso por alcoholes de 96°, 80° y 70° 5 minutos cada uno

Agua destilada (5 minutos)

Violeta de Cresilo (en frío) al 1% (10 minutos)

Agua destilada (15 minutos)

Paso en alcohol 70° (30 seg)

Paso por alcohol 96° (5 minutos)

Alcohol 96° adicionado de ácido acético hasta quedar diferenciado

Alcohol absoluto (5 minutos)

Xileno y cubrir con resina histológica Entellan (MERCK).

## **11.6.- METODOS DE ANALISIS**

### **11.6.a.- ANALISIS HISTOLOGICO**

#### **CUANTIFICACIÓN NEURONAL CON MICROSCOPIA DE LUZ.**

Para el conteo de células se utilizaron 5 cortes coronales por animal, por cada grupo. La delimitación de cada área se realizó de acuerdo a criterios establecidos ( Blackstad, 1956; Boss, 1987; West, 1991).

Inicialmente se obtuvieron fotografías del hipocampo a una amplificación de 4X, para delimitar el área de estudio (Figura 5), posteriormente con ayuda de un microscopio monitorizado y un analizador de imágenes con programa Image Data Base V 4.01 a una magnificación de 400 X, se realizó conteo celular en forma ciega en cada hemisferio en sectores de 500  $\mu\text{m}$  de longitud en todo el espesor de la capa piramidal para las áreas CA1 y CA3.

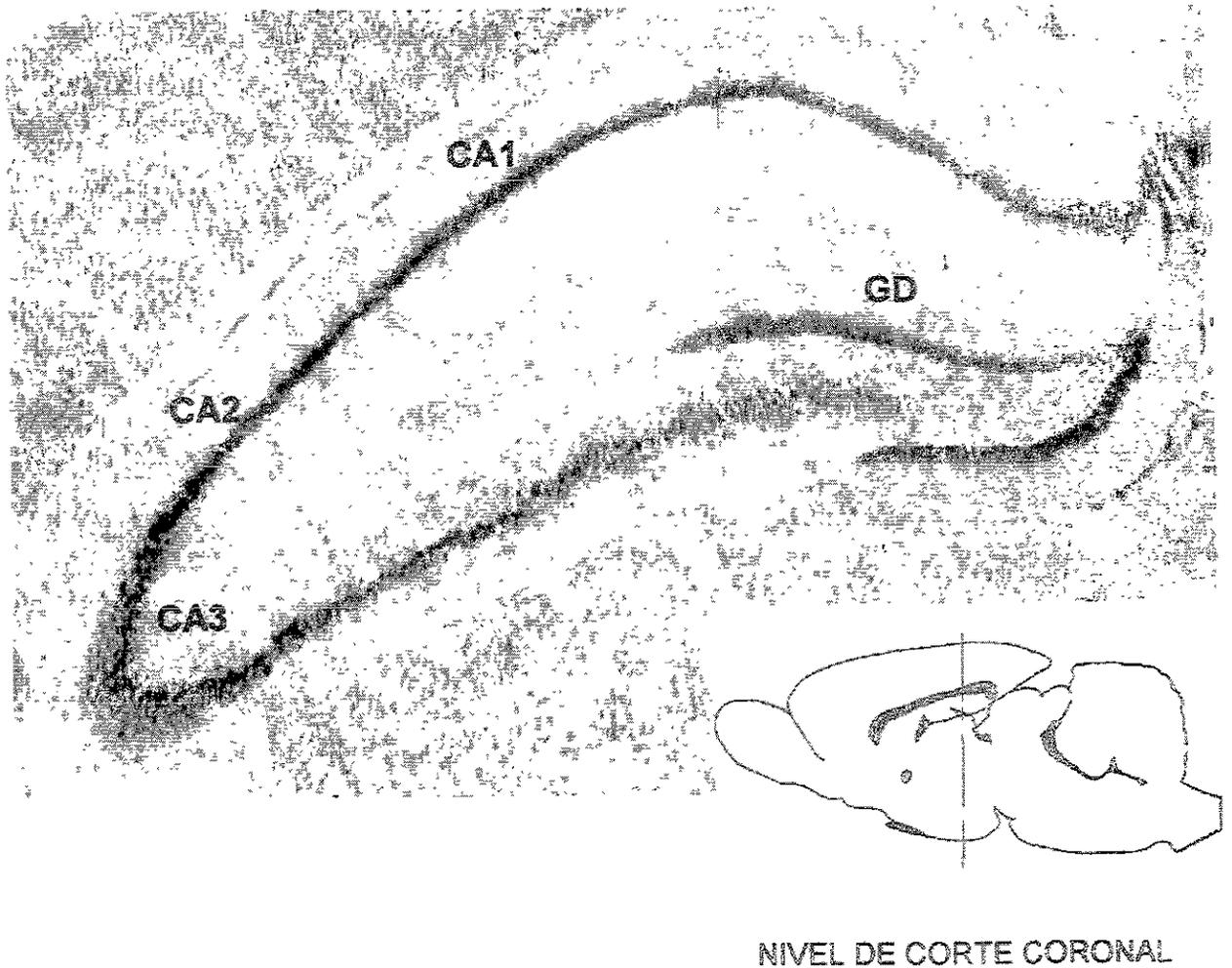
El criterio para incluir una neurona como viable, se determinó como la uniformidad morfológica: contorno de la membrana celular bien definido, sin áreas rotas, citoplasma claro, sin pérdida de estructura, núcleo central, ovalado o redondo.

### **11.6.b.- METODO ESTADISTICO**

Se realizó estadística descriptiva: para calcular promedios, porcentajes y elaborar gráficas de barras. Los resultados de las evaluaciones se sometieron a pruebas de normalidad. La probabilidad de demostrar diferencias entre los grupos se determinó como  $p < 0.05$ .

#### **11.6.c.- CONSIDERACIONES ETICAS DEL USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN BIOMÉDICA.**

El presente proyecto fue aprobado para su realización por el Comité Local de Investigación del Hospital de Especialidades " Dr. Bernardo Sepúlveda G" de Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Todos los procedimientos realizados fueron apegados a los Reglamentos y Normas Institucionales, Normas Oficiales Mexicanas para: producción, cuidado y uso de animales de laboratorio ( PROY-NOM-062-ZOO-1999 ), reporte de resultados de pruebas y análisis de forma clara y sin ambigüedades ( NOM-003- ZOO-1994), sacrificio humanitario de animales ( NOM-033-ZOO-1995) y Título séptimo de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud para la utilización de animales de investigación.



NIVEL DE CORTE CORONAL

FIGURA 5. Fotomicrografía de hipocampo dorsal derecho de gerbo 40 X  
En la sección inferior derecha nivel de corte coronal.  
Áreas CA1, CA2, CA3 y giro dentado ( GD ) de formación hipocámpal

## 12- RESULTADOS

### 12.1.- Análisis estadístico

El análisis de normalidad demostró que los datos en cada grupo presentaron una distribución anormal, por este motivo, las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron mediante pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis seguidas de una prueba *post hoc* Student Newman Keuls, con un programa estadístico Sigma Stat.

### 12.2.- Analisis morfologico

El daño histológico adoptó patrones variables. En los animales sin tratamiento, la apariencia histológica del hipocampo se caracterizó por la presencia de neuronas "fantasma" y células retraídas y oscuras, alternadas con células consideradas viables (Figura 6B,C; 6D-F). Se encontraron zonas de espacios vacíos en el parénquima del hipocampo que coincidieron con áreas de retracción celular ( 6A,B ), además del aspecto esponjoso en el estrato radiado ( 6B-E ), posiblemente como consecuencia del edema de las prolongaciones neuronales y de zonas de retracción.

El promedio de células en 500  $\mu\text{m}$  en los grupos de isquemia fue de  $59.26 \pm 9.67$  para CA1 y de  $34.5 \pm 3.88$  para CA3, para el grupo sham, en CA1 se contaron  $70.30 \pm 12.1$  y  $60.56 \pm 10.5$  en CA3 (Tabla 2).

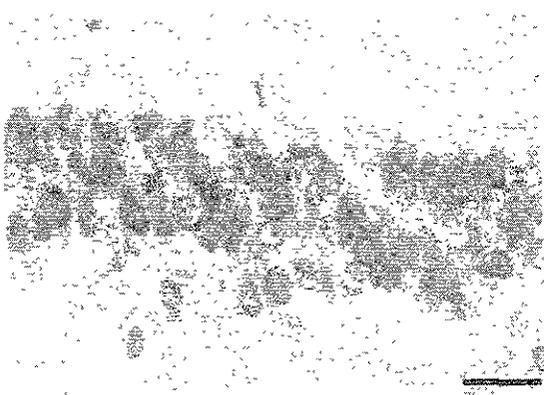
En CA1 los grupos que presentaron mayor preservación neuronal fueron en orden de importancia MP +SM > MP > ETO > ETO+MP con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Los grupos que recibieron SM y ETO+SM, tuvieron un número promedio de sobrevivencia de neuronas de 2.79 y 2.30 respectivamente, contra 59.26 del grupo de isquemia sin tratamiento (Figuras 7, 9. Grafica 1, Tabla 2).

Para CA3, el mayor beneficio sobre la preservación de células se encontró en MP > ETO > ETO + MP > MP + SM > ETO + SM ( $p < 0.05$ ). El grupo de SM presentó una reducción en el número de células de 5% comparado con el grupo de isquemia (Figura 8, 10. Grafica 2, Tabla 2)

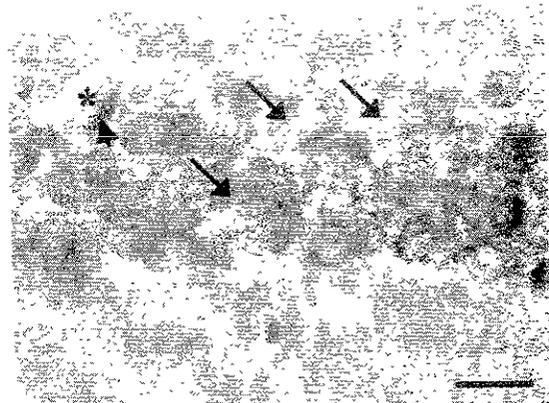
En las figuras 7 y 8 se muestran respectivamente las fotomicrografías de áreas CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de gerbos evaluados con administración profiláctica aislada de fármacos.

Los grupos que presentaron preservación de la morfología neuronal, correspondieron para CA1, ETO y MP. En el grupo de MP se observa mejor preservación de células y de la arquitectura del neuropilo, el grupo de ETO presenta aspecto esponjoso del estrato radiado y células con cambios por edema con algunos espacios vacíos (asteriscos). El grupo de SM presentó mayor daño de la citoarquitectura piramidal comparado con el grupo sin tratamiento (isquemia). Se observa desintegración del estrato piramidal. El daño celular aparece como zonas oscuras (cabeza de flechas), rodeadas de espacios vacíos (asterisco).

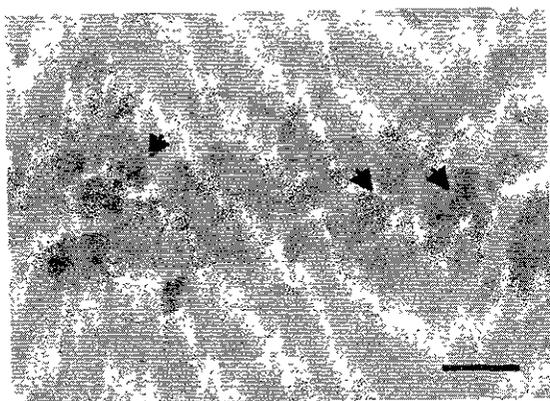
En el área CA3, la administración de MP preservó mejor la morfología neuronal, debido a que se encontró menor evidencia de cambios isquémicos comparado con el grupo de ETO que fue el siguiente más efectivo. El grupo de SM ocasionó mayor beneficio que en área CA1, sin embargo hubo presencia de neuronas con aspecto "fantasma" (flechas) rodeadas de espacios vacíos.



NORMAL



SHAM



ISQUEMIA

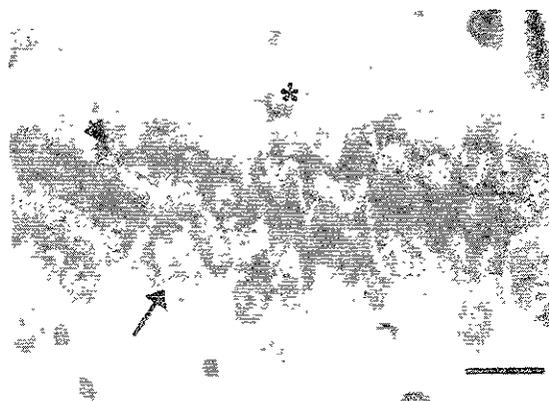
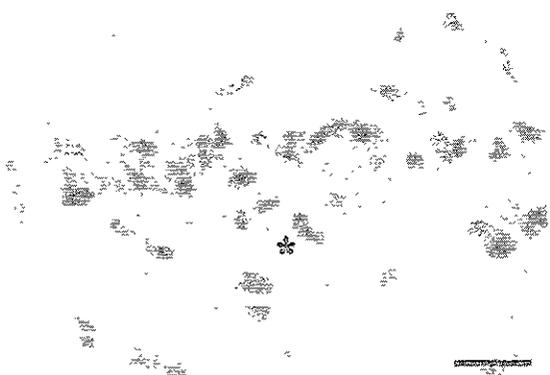
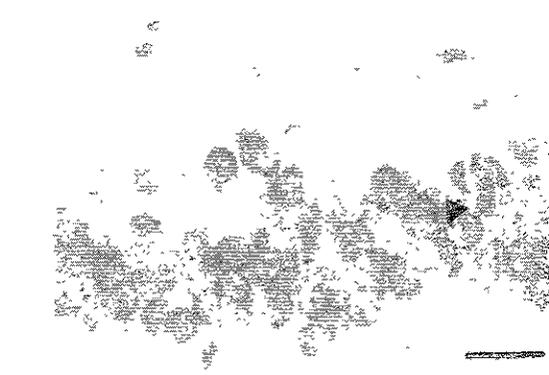
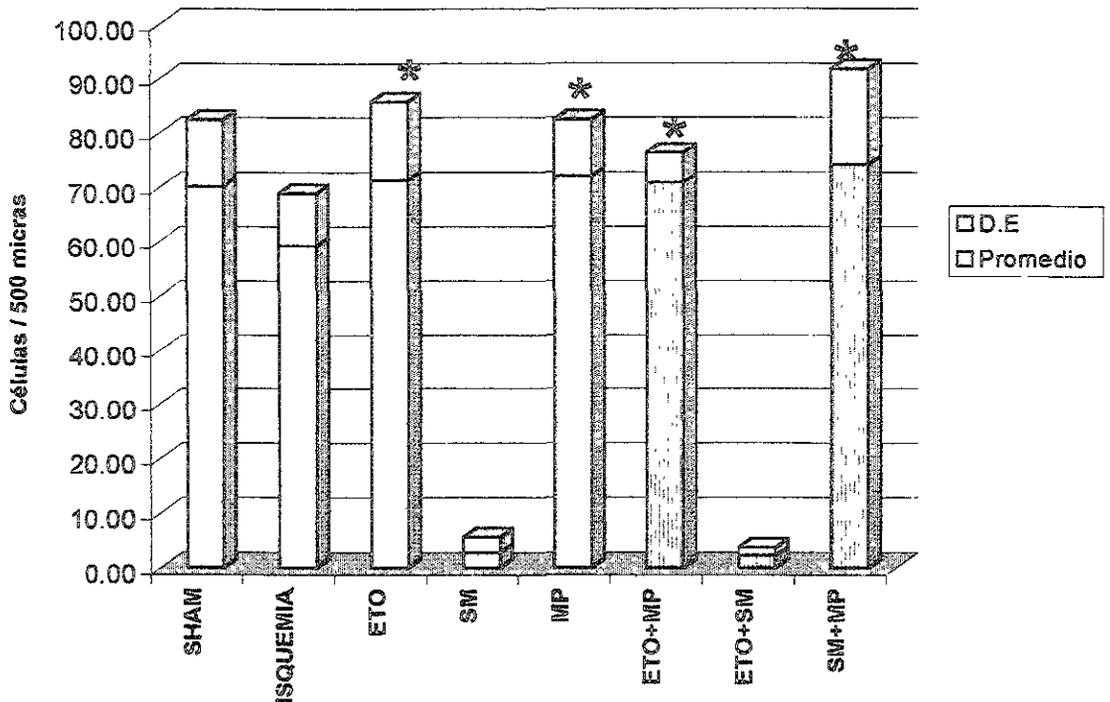
ETOMIDATO +  
METILPREDNISOLONAETOMIDATO +  
SULFATO DE MAGNESIOSULFATO DE MAGNESIO +  
METILPREDNISOLONA

FIGURA 9. Fotomicrografías de luz de hipocampo dorsal de gerbos area CA1 7 días después de la lesión por isquemia-reperfusión. Violeta de cresilo. 400x  
Barra 1 cm = 14  $\mu$ m

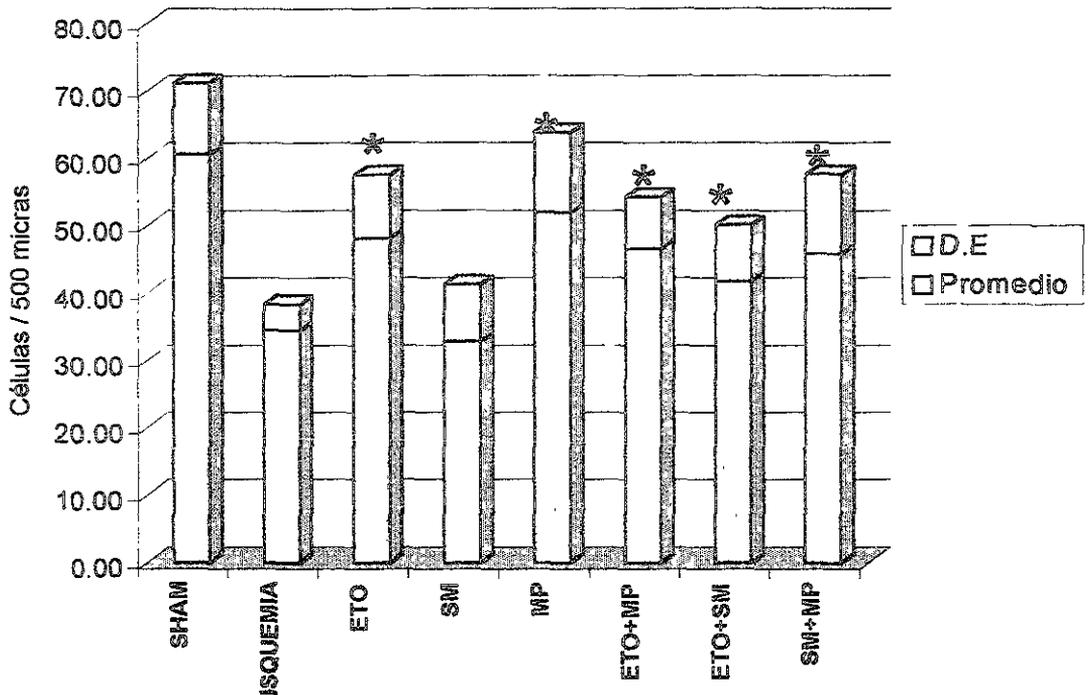
### NUMERO DE CELULAS VIVAS EN AREA CA1 DE HIPOCAMPO DORSAL



GRAFICA 1. Promedios, D.E. Kruskal-Wallis, N= 7 por grupo. \* p< 0.05

La gráfica 1 muestra los promedios de neuronas piramidales viables en área CA1 de hipocampo dorsal de los grupos evaluados. La mejor respuesta comparada con el grupo de isquemia, se obtuvo con la asociación MP+SM con un promedio de  $74.2 \pm 17.54$  células en 500  $\mu\text{m}$  de longitud, seguido de MP con  $72.04 \pm 10.42$  células y ETO con  $71.41 \pm 14.39$ . No se encontró diferencia significativa de la respuesta al tratamiento entre ETO y ETO + MP, siendo ambas administraciones igual de efectivas. Sobresale el efecto negativo de SM y ETO+SM, las cuales ocasionaron un daño más severo en esta área que el grupo no tratado. El grupo ETO y ETO + MP mostraron un porcentaje del número de células similar al del grupo sham, seguido de MP con 2.4% por arriba del conteo y MP+ SM con un aumento de 5% comparado con el de simulación quirúrgica.

## NUMERO DE CELULAS VIVAS EN AREA CA3 DE HIPOCAMPO DORSAL

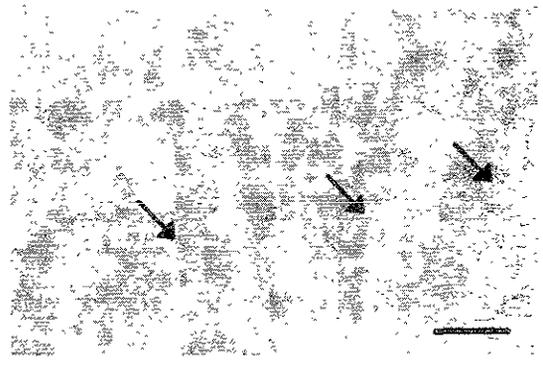


GRAFICA 2. Promedios, D.E. Kruskal-Wallis, N= 7 por grupo. \* p< 0.05

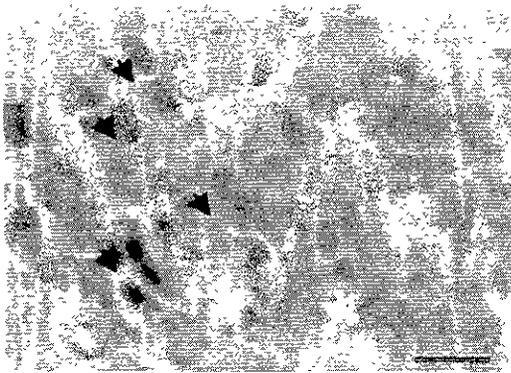
La gráfica 2 muestra el número de neuronas piramidales en 500  $\mu\text{m}$  de longitud del área CA3 de hipocampo dorsal de gerbos evaluados. La mejor respuesta comparada contra el grupo de isquemia sin tratamiento fue la administración de MP ( $51.90 \pm 1.88$ ), seguido de ETO ( $48.2 \pm 9.34$ ). Las asociaciones ETO+MP y SM +MP fueron tan efectivas como la administración ETO+SM. En este caso, la respuesta del pretratamiento con SM ocasionó un daño similar al del grupo no tratado. En ninguno de los casos los fármacos administrados resultaron en una mejoría significativa comparada con el grupo sham.



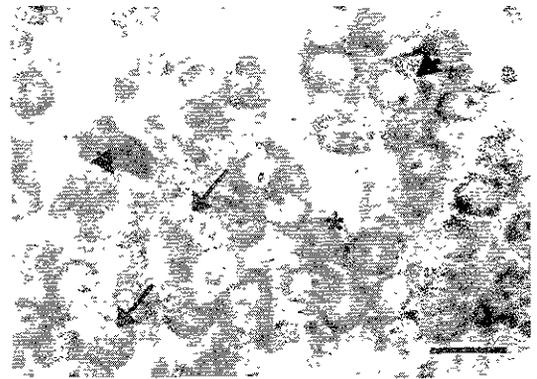
NORMAL



SHAM



ISQUEMIA



ETOMIDATO + METILPREDNISOLONA

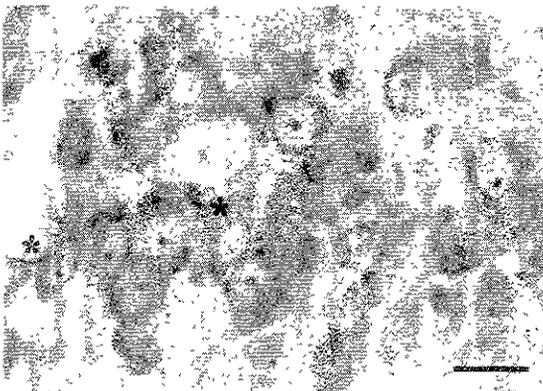
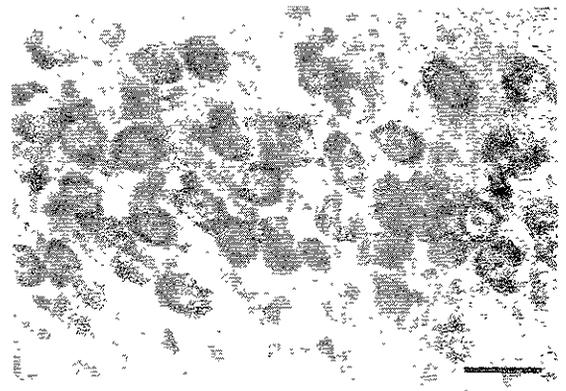
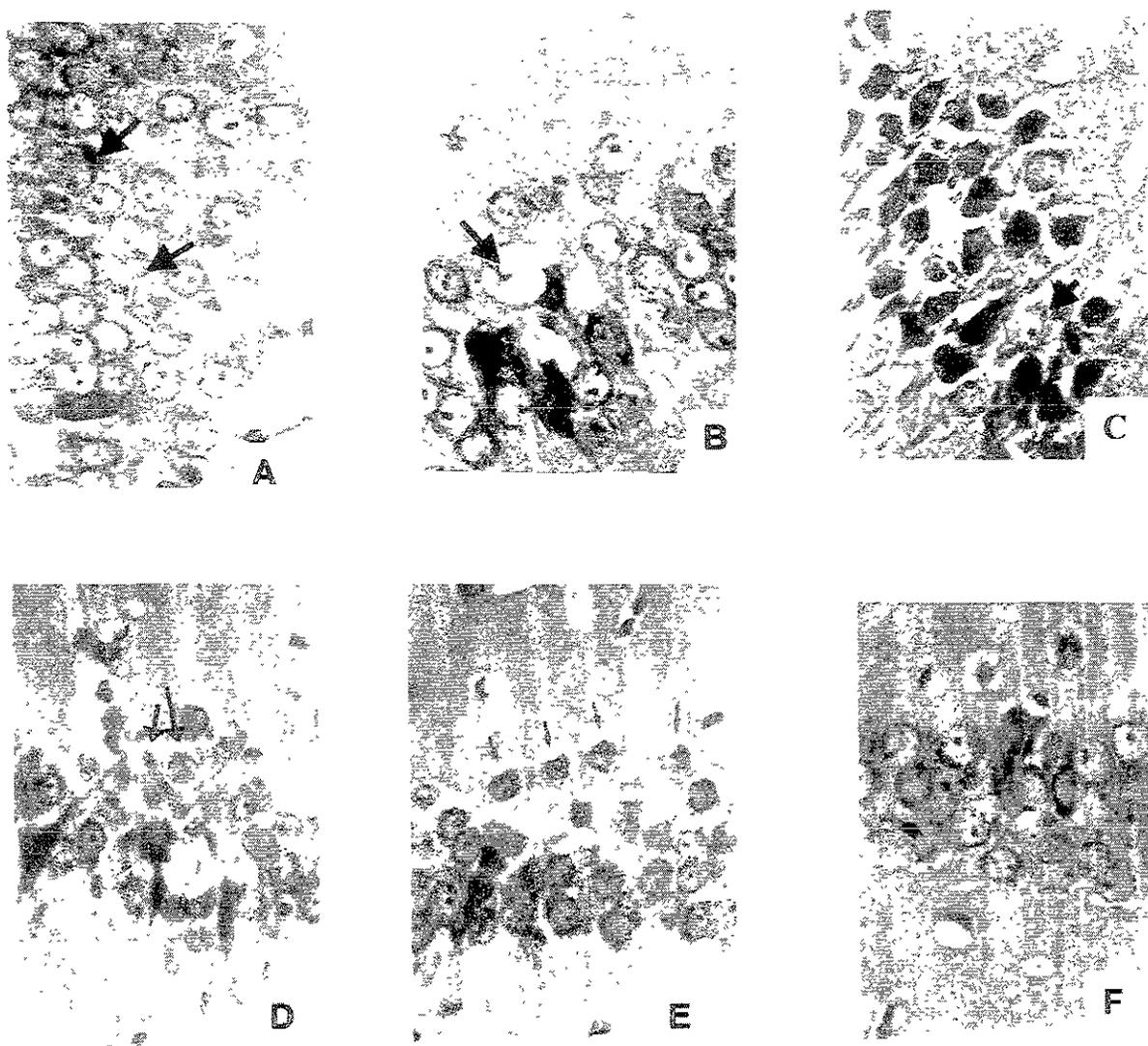
ETOMIDATO +  
SULFATO DE MAGNESIOSULFATO DE MAGNESIO +  
METILPREDNISOLONA

FIGURA 10. Fotomicrografías de luz de hipocampo dorsal de gerbos area CA3, 7 días después de la lesión por isquemia-reperfusión. Violeta de cresilo. 400x  
Barra 1 cm = 14  $\mu$ m

Las figuras 9 y 10 representan fotomicrografías de áreas CA1 y CA3 respectivamente de hipocampo dorsal de gerbos sometidos a evaluación profiláctica con asociaciones de fármacos.

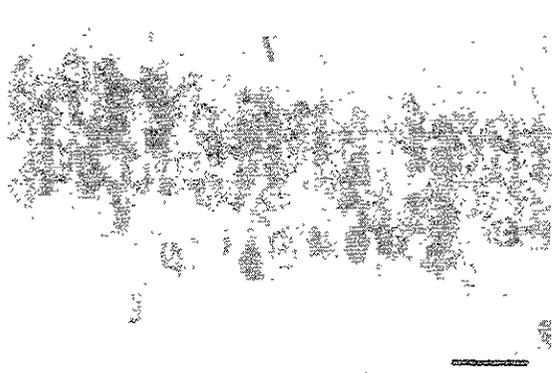
Para CA1, la asociación SM+MP conservó mejor la morfología neuronal, el grupo de ETO+MP presentó en el estrato radiado aspecto esponjoso y algunas zonas de retracción celular (asterisco). La asociación de ETO+SM, resultó en destrucción completa de la capa piramidal.

En CA3 SM+MP conservó la morfología piramidal de manera más evidente, ETO+MP no logró disminuir el daño por cambios isquémicos y el edema celular (flechas). La asociación ETO+SM no demostró mejor efecto que las otras asociaciones.

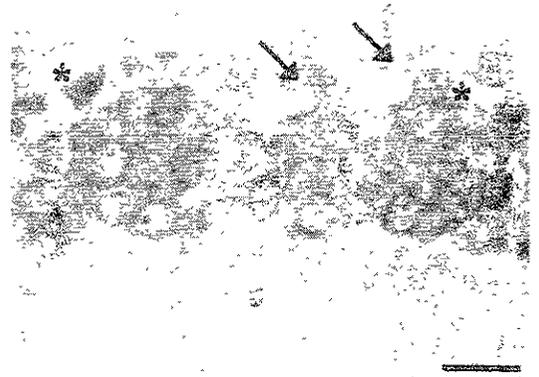


**FIGURA 6 .** Fotomicrografías de luz de neuronas piramidales con tinción de violeta de cresilo de hipocampo dorsal de gerbos con isquemia sin tratamiento. 1000 X.

A.- Células apoptóticas de CA1, con cambios en el patrón nuclear, y "aparición fantasma" (flechas) B.-La flecha señala un área vacía por contracción celular, rodeada de neuronas con cambios isquémicos y otras con cambios por edema. Obsérvese el aspecto esponjoso del neuropilo. C.- Células de CA3 con cambios isquémicos, se encuentra una célula con desplazamiento del núcleo y nucleoplasma vacuolado (flecha). D y E.- Cambios isquémicos con aspecto irregular de la membrana plasmática por contracción (flechas) se encuentra el mismo patrón esponjoso del estrato radiado. F.--Cambios celulares homogeneizados en CA3 (flechas) algunas células con aspecto edematoso se encuentran rodeadas de células con contracción y espacios vacíos.



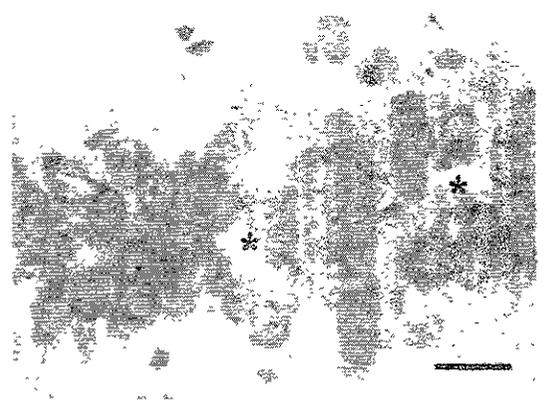
NORMAL



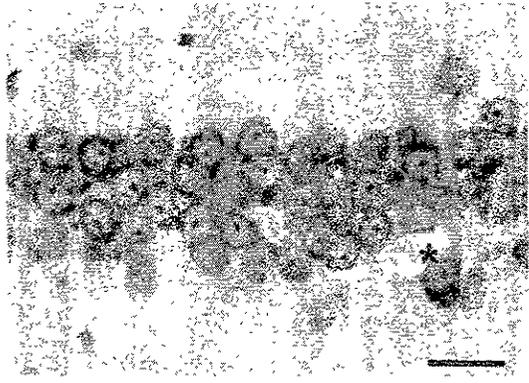
SHAM



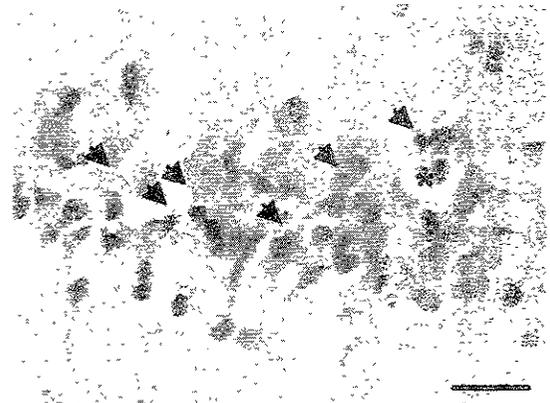
ISQUEMIA



ETOMIDATO



METILPREDNISOLONA

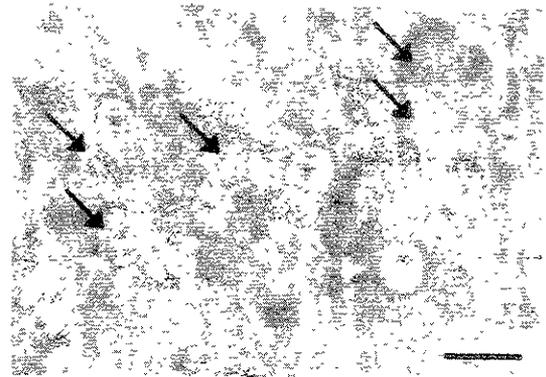


SULFATO DE MAGNESIO

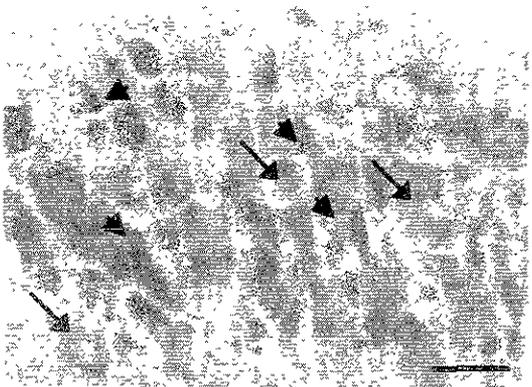
FIGURA 7. Fotomicrografías de luz de hipocampo dorsal de gerbos area CA1, 7 días después de la lesión por isquemia-reperfusión. Violeta de cresilo. 400x Barra 1 cm = 14  $\mu$ m.



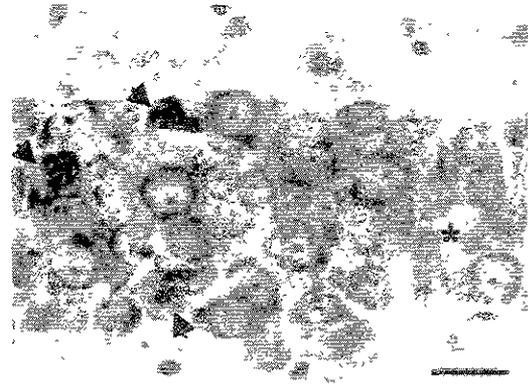
NORMAL



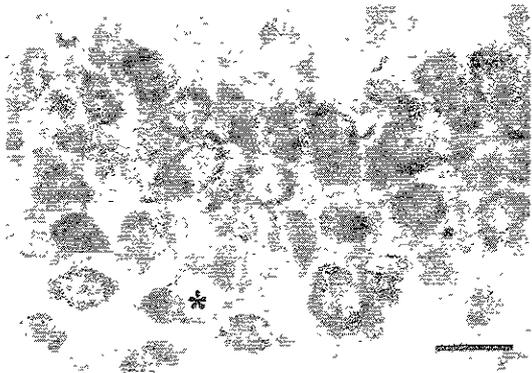
SHAM



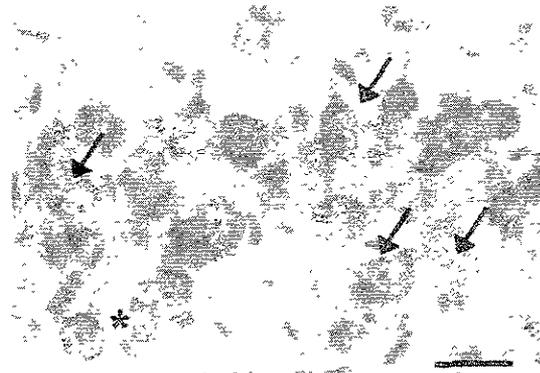
ISQUEMIA



ETOMIDATO



METILPREDNISOLONA



SULFATO DE MAGNESIO

FIGURA 8. Fotomicrografías de luz de hipocampo dorsal de gerbos area CA3, 7 días después de la lesión por isquemia-reperfusión. Violeta de cresilo. 400x  
Barra 1 cm = 14  $\mu$ m

TABLA 2. NUMERO DE NEURONAS PIRAMIDALES VIABLES EN 500  $\mu$ m DE LONGITUD EN AREAS CA1 Y CA3 DE HIPOCAMPO DORSAL

GRUPO	CA1	CA3
SHAM	70.30 $\pm$ 12.1	60.56 $\pm$ 10.5
ISQUEMIA	59.26 $\pm$ 9.67	34.5 $\pm$ 3.88
ETOMIDATO	71.41 $\pm$ 14.39*	48.2 $\pm$ 9.34*
SULFATO DE MAGNESIO	2.79 $\pm$ 2.81	32.8 $\pm$ 8.49
METILPREDNISOLONA	72.04 $\pm$ 10.42*	51.90 $\pm$ 11.88*
ETOMIDATO METILPREDNISOLONA	70.91 $\pm$ 5.48*	46.6 $\pm$ 7.62*
ETOMIDATO SULFATO DE MAGNESIO	2.30 $\pm$ 1.48	41.8 $\pm$ 8.3*
METILPREDNISOLONA SULFATO DE MAGNESIO	74.23 $\pm$ 17.54*	45.80 $\pm$ 11.81*

Los valores representan promedios  $\pm$  D.E. Kruskal-Wallis, N= 7 por grupo. \* p < 0.05 con respecto al grupo de isquemia.

### 13.- DISCUSIÓN

La lesión neuronal por isquemia-reperfusion, es ocasionada por diversos mecanismos celulares iniciados por la isquemia y que se incrementan durante la recirculación (Nakamura, 1999; Ironside, 2000; Neumar; Uhl, 2000 ). La intensidad de la lesión depende de dos variables: la reducción del flujo sanguíneo y el tiempo de isquemia (Araki, 1989 ). Esto ocasiona inicialmente aumento de calcio intracelular, que condiciona la activación de enzimas y amplifican el daño; excitotoxicidad, la cual es mediada por sobreestimulación de receptores de glutamato (NMDA) y llevan a despolarización anóxica de la célula y la formación de especies reactivas de oxígeno, a partir de la alteración en el reciclado de protones en la mitocondria, que condiciona acidosis intracelular por desviación hacia el metabolismo anaerobio.

Hace casi dos décadas se plantearon los primeros intentos para reducir los daños por la lesión isquémica por intervención a nivel celular (Crockard, 1980; Astrup, 1982; Hass, 1983 ), pero no ha sido hasta los últimos años, en que estas posibilidades terapéuticas han pasado a ser expectativas reales de tratamiento. Esta actitud terapéutica ha tenido como base los avances en el conocimiento de los complejos mecanismos fisiopatológicos involucrados en la isquemia cerebral, el desarrollo de nuevos fármacos y la necesidad de un inicio precoz del tratamiento. Los diversos agentes que previenen la progresión y reducen el daño, interviniendo en más de un punto de la cascada isquémica, se conocen como neuroprotectores o citoprotectores (Matias-Guiu, 1988).

Estudios en animales experimentales han proporcionado una descripción detallada de los cambios que se producen en el FSC y en el metabolismo durante y después de la isquemia cerebral, así como evaluación de medidas terapéuticas (Wiebwers, 1990; Zivin, 1990; Small, 2000).

Globalmente considerados, los resultados de más de 800 ensayos clínicos, con más de 30 sustancias con potencial capacidad neuroprotectora investigadas o en fase de estudio, hasta la fecha, deben considerarse como negativos; si bien existen matices o aspectos parciales, o análisis *post hoc*, que pueden indicar algún tipo de beneficio (Mostacero, 1999; Lee, 2000), la efectividad clínica de algunas de estas estrategias no ha sido comprobada por haber sido abandonadas debido a sus efectos adversos sobre sus efectos beneficiosos.

Una variedad de antagonistas competitivos y no competitivos de la NMDA, bloqueadores de la liberación de AAE, como glutamato, así como inhibidores de la entrada de  $Ca^{2+}$ , y atrapadores de radicales libres, se ha desarrollado y probado en modelos animales. (Ginsberg, 1995a, 1995b; Brott, 2000; Gagliardi, 2000; Chua, 2001).

La MP ha sido utilizada como tratamiento protector en modelos de lesión de médula espinal de rata, en isquemia cerebral en ratas y en gerbos (McGraw, 1974; Hall, 1992).

En la clínica se emplea principalmente para disminuir el edema cerebral. Básicamente sus mecanismos de acción inhiben la peroxidación lipídica y la acumulación de calcio intracelular y también se ha relacionado con reducción de procesos inflamatorios (Behrmann, 1994), lo que explica en nuestros resultados la mejor preservación de la morfología neuronal.

La dosis reportada como protectora en modelos de isquemia cerebral en rata es de 30 mg / kg administrados a diferentes tiempos a la oclusión arterial. Existe un reporte que demuestra la preservación *ex vivo* de la bomba  $Na^{+}$ -K-ATPasa en un estudio en gerbos con 10 minutos de oclusión de ACC y administración de la dosis descrita, 30 minutos antes de producirse la isquemia (Palmer, 1985), y evaluaciones realizadas en modelo de gerbos con 15 minutos de isquemia, con 7 días de sobrevida con administración de

MP a dosis de 60 mg / kg, 30 minutos antes y 2 horas después del evento, han reportado mayor pérdida neuronal en CA1 en comparación con gerbos no tratados. Otro estudio ( Braughier, 1986) ha reportado recuperación neurológica en un modelo de oclusión unilateral de ACC con dosis de 60 mg / kg i.p, 10 minutos antes de la lesión, lo cual no puede ser considerado como dato relevante, debido al conocimiento que se tiene de la diversa morfología de la circulación arterial de la base de cerebro y la presencia de arterias comunicantes posteriores de manera variante que no permiten el logro de una isquemia constante en estos animales.

En los grupos evaluados en esta tesis, la MP preserva mejor la morfología neuronal, quizá la preservación de las bombas de membrana y en consecuencia de la homeostasis celular sean causa de este resultado, el cual es concluyente los reportes descritos anteriormente. Además, a diferencia del grupo de Braugler, se realizó oclusión bilateral, lo que permite caracterizar mejor la acción protectora del fármaco, lo cual no puede concluirse en ese estudio.

El ETO, clínicamente utilizado como anestésico y agente neuroprotector, su mecanismo de acción propuesto es a través de la disminución de la actividad neuronal, lo cual suprime el metabolismo de oxígeno y glucosa cerebral ( Evans, 1978)

Se ha reportado que reduce el daño histológico en hipocampo, en modelos de isquemia cerebral en rata a dosis de  $0.6 \text{ mg / kg / }^{-1} \text{ min}^{-1}$ . (Patel, 1995). En gerbos se ha evaluado solo la recuperación neurológica en un modelo con y sin ligadura de ACC, comparando etomidato con tiopental y éter ( Hermans, 1983).

Los resultados de este trabajo, pueden compararse con lo reportado en la literatura, debido a que la dosis empleada, presenta en la evaluación morfológica mejor preservación de las células a pesar de que no se realizó una evaluación de la

recuperación neurológica como en el modelo de Hermans, se tiene la constante de una oclusión bilateral en todos los casos, lo que permite concluir el efecto neuroprotector de este fármaco.

Los efectos citoprotectores del sulfato de magnesio, han sido comprobados por diversos estudios en modelos experimentales de isquemia cerebral focal, isquemia de médula espinal, y daño traumático cerebral (Marinov, 1996; Heath, 1999a; Heath, 1999b; Lang, 2000 ; Yangn, 2000 ). Como antagonista no competitivo del NMDA con efectos neuroprotectores, se ha evaluado a diferentes dosis en administración parenteral 30 min antes o 30 min después de producirse la lesión. Sin embargo, los resultados de los estudios no son concluyentes, ya que existen reportes tanto de protección como de no protección, con diferentes tiempos de administración y dosis ( Sameshima, 1999, 2001). En gerbos, este fármaco no ha sido evaluado, así que posiblemente las dosis y los efectos descritos no deben esperarse que sean los reportados en otros modelos.

Sin embargo, existen consideraciones que son concluyentes con respecto al tratamiento con SM: 1).- su administración antes de la hipoxia o isquemia es neuroprotectora, 2).- la preservación neuronal se limita a la corteza cerebral y 3).- con el tratamiento posterior a la isquemia aumenta la pérdida neuronal en la corteza cerebral e hipocampo. Otros estudios describen que la administración de dosis menores a 30 mg / kg aumenta el daño neuronal por peroxidación lipídica (Suzer, 1999 )

En este trabajo se demuestra que las evaluaciones en este modelo no son comparables con otros estudios, ya que la dosis protectoras de SM administrada en modelos de isquemia cerebral en ratas, no produce los mismos resultados en el gerbo, porque incrementa el daño, principalmente en el área CA1 donde destruye la capa piramidal.

Los resultados demuestran que los fármacos evaluados en este modelo ofrecen una

acción protectora, dicha respuesta se encontró en los grupos de MP +SM, MP, ETO, ETO+MP, la cual fue diferente para CA1 y CA3, debido posiblemente a una diferencia en la densidad de receptores glutamatergicos, la cual se han reportado con mayor población para CA1, contrario a CA3 donde la mayor densidad de receptores corresponde a AMPA, resultando de esta manera, más beneficio con la asociación de fármacos en CA1. La administración de SM y SM+ETO en CA1 fue deletérea, no así en el área CA3, donde el efecto de SM fue igual al ocasionado en el grupo sin tratamiento y la asociación SM+ ETO fue igual de efectiva que en el grupo de ETO+MP.

Lo anterior indica una acción de bloqueo de algunas etapas de la cascada isquémica por la administración de fármacos y tal vez, una potenciación de sus efectos protectores, como en el caso de ETO+SM en CA3, donde se encontró mayor preservación de células, comparado con la administración aislada de SM, esto debido a que sus mecanismos de acción son básicamente sobre los principales iniciadores y perpetuadores del daño por isquemia cerebral ( Figura 3)

También puede describirse que existen diferentes respuestas a la isquemia y la acción de los fármacos en cada área del hipocampo.

Un efecto morfológico encontrado en los grupos MP, ETO+MP y SM+MP, fue un menor número de células con cambios isquémicos en todas las áreas evaluadas; no así en los grupos de SM y ETO, donde se encontraron todavía cambios por la isquemia en el estrato radiado y en la morfología neuronal, y en el caso de SM fueron aún más severos. Algunos reportes de la literatura mencionan que a dosis menores a las descritas como neuroprotectoras, el SM no es capaz de inhibir la peroxidación lipídica(), y en dosis mayores, ocasiona hiperglicemia que favorece aún más el daño neuronal (). Sin embargo, el porcentaje de 20% en la sobrevivencia de neuronas con los tratamientos

evaluados, no representa el beneficio deseado, pero ofrece la opción de utilizar agentes farmacológicos de uso clínico, con acción neuroprotectora, y que pueden ser asociados para potenciar su efectividad en la prevención o disminución de lesiones por compromisos vasculares cerebrales.

Además, los mecanismos de acción y efectos secundarios de estas sustancias son conocidos y esto representa una ventaja sobre otros diseños que no han tenido resultados positivos en la clínica.

El tiempo utilizado de 20 minutos de isquemia y 7 días de sobrevida se estableció en un modelo previo para conocer los cambios por isquemia-reperfusión en esta región del cerebro de gerbo y se comprobó que los animales evaluados presentaban daños severos por isquemia, lo que no ha sido considerado por otros autores.

Los resultados obtenidos no son concluyentes con otros autores, ya que el modelo empleado para la evaluación de estos fármacos tiene la característica de las variaciones en la morfología de la circulación cerebral, lo que posiblemente represente un aspecto determinante en la respuesta a la acción de los fármacos.

En este trabajo se demuestra en forma cuantitativa y con estudios morfológicos de microscopía de luz, el efecto de MP, ETO Y SM en la preservación de neuronas piramidales de hipocampo dorsal.

Además, demuestra que, al menos en este modelo el SM a la dosis reportadas por otros autores, no es neuroprotector para el CA1 de hipocampo dorsal de gerbos. Se presenta también el beneficio de la asociación de fármacos en casi todos los grupos evaluados, lo que apoya la hipótesis inicialmente propuesta para este trabajo.

#### 14.- CONCLUSIONES

- 1.- Existe una lesión diferente en cada sector del hipocampo dorsal, en respuesta a la isquemia-reperfusión.
- 2.- La respuesta a la acción de los fármacos es diferente para cada sector del hipocampo.
- 3.- Las dosis reportadas de SM como protectoras en otros modelos, no son benéficas en la isquemia cerebral en gerbos.
- 4.- La asociación de fármacos en la mayoría de los grupos evaluados resulta en disminución del daño por isquemia.

#### 15.- PERSPECTIVAS A FUTURO

- 1.- Conocer si la respuesta al daño por isquemia-reperfusión es diferente en otros tiempos de sobrevida.
- 2.- Evaluar si los resultados obtenidos en este trabajo son mejores cuando el tratamiento se inicia después de los eventos de isquemia-reperfusión
- 3.- Conocer si existe una relación del efecto de la neuroprotección en el hipocampo dorsal con la recuperación de conducta.
- 4.- Evaluar el sulfato de magnesio para conocer la dosis de neuroprotección en este modelo.

Para la realización de este proyecto se obtuvo financiamiento del Fondo para el Fomento de la Investigación Médica de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Financiamiento Número FP-0038-739.

#### 14.- CONCLUSIONES

- 1.- Existe una lesión diferente en cada sector del hipocampo dorsal, en respuesta a la isquemia-reperfusión.
- 2.- La respuesta a la acción de los fármacos es diferente para cada sector del hipocampo.
- 3.- Las dosis reportadas de SM como protectoras en otros modelos, no son benéficas en la isquemia cerebral en gerbos.
- 4.- La asociación de fármacos en la mayoría de los grupos evaluados resulta en disminución del daño por isquemia.

#### 15.- PERSPECTIVAS A FUTURO

- 1.- Conocer si la respuesta al daño por isquemia-reperfusión es diferente en otros tiempos de sobrevida.
- 2.- Evaluar si los resultados obtenidos en este trabajo son mejores cuando el tratamiento se inicia después de los eventos de isquemia-reperfusión
- 3.- Conocer si existe una relación del efecto de la neuroprotección en el hipocampo dorsal con la recuperación de conducta.
- 4.- Evaluar el sulfato de magnesio para conocer la dosis de neuroprotección en este modelo.

Para la realización de este proyecto se obtuvo financiamiento del Fondo para el Fomento de la Investigación Médica de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Financiamiento Número FP-0038-739.

## 16.- REFERENCIAS

- Akai F and T Yanagihara. (1993) Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res* 603: 87-95
- Albers GW, Goldberger MP, Choi DW. (1989) N-Methyl-D-aspartate antagonist. Ready for clinical trial in brain ischemia? *Ann Neurol* 25: 399-403
- Amaral D G., Menno PW. Hippocampal Formation . En: The rat nervous system. Second Edition. Edited by George Paxinos. Academic Press. 1995 443-485
- Ames A., Lewis W. (1968) Cerebral Ischemia. II. The No-Reflow phenomenon. *Brain Res* 52 (2) 437-451.
- Araki T, H. Kato, K. Kogure. (1989) Selective vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand* 80: 548-553.
- Aronowski J., Grotta J., Waxham M.(1992) Ischemia-induced translocation of Ca<sup>2++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: potential role in neuronal damage. *J Neurochem* 58, 1743-1753.
- Asano T, Hidaka H, Ikegati I. (1991) Blockade of intracellular actions of calcium may protect against ischemic damage to the gerbil brain. *Br J Pharmacol*; 103: 1935-1938
- Astrup J. (1982) Energy –requiring cell functions in the ischemic brain. *J Neurosurg.* 56: 482-497
- Basile AM, Nencini P, Inzitari D. (1999) The molecular mechanisms of cerebral ischemia: the possible therapeutic interventions. *Ann Ital Med Int* 14 (2): 94-105
- Batjer HH (1993) Cerebral protective effects of etomidate: experimental and clinical aspects. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 5(1): 17-32

Bereczki D, Csiba L, Nemeth G. (1988) The vulnerability of gerbils to focal cerebral ischemia. Neurological signs and regional biochemical changes after ischemia and recirculation. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci.* 238(1):11-18

Behrmann DL, Bresnahan JC. (1994) Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. *Exp Neurol* 126 (1): 61-75.

Blackstad TW. (1956) Studies on the hippocampus: methods of analysis. *UCLA Forum Med Sci.* 11: 391-414.

Boss BD, Turlejski K, Stanfield BB. (1987) On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res* 17: 406 (1-2): 280-287.

Bracken M, William F. (1984). Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA* 251: 45-52.

Braughler J., Mark H. ( 1985) Current application of "high-dose" steroid therapy for CNS injury. *J Neurosurg* 62: 806-810

Braughler JM, Lainer MJ .(1986) The effects of large doses of methylprednisolone on neurologic recovery and survival in the Mongolian gerbil following three hours of unilateral carotid occlusion *Cent Nerv Syst Trauma* 3(2):153-162

Brott T; Bogousslavsky J. (2000) Drug therapy: treatment of acute ischemic stroke. *New Engl J Med* 343(10): 710-722.

Carden DL, Granger DN. (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 190(3):255-266

- Castillo J, Rama R, Davalos A. (2000) Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 31(4):852-857.
- Castro Pacheco G.A, Foyo Niembro EA., Perez Perez VH., Garcia Hernandez J., Grijalva Otero I. (2001) Comunicación arterial carótido-basilar en gerbos (*Meriones Unguiculatus*). *Rev Neurol (Barcelona)*1-15; 32(3):225-228
- Chahal H, D'Souza SW, Barson AJ, Salter P. (1998) Modulation by magnesium of N-methyl-D-aspartate receptors in developing human brain. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 78(2) F116-20
- Chan PH. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(1): 2-14.
- Chen T., Jasmina B., (1996) Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 38 (2) 348-354.
- Choi DW. ( 1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23 (9) 1261-1276
- Choi DW. (1990) Methods for antagonizing glutamate toxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2: 105-143
- Chua HC (2001). Neuroprotection in acute stroke. *Ann Acad Med* 30(2):134-142
- Clemens JA. (2000) Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 15;28(10):1526-1531.
- Clifton GL, WC Taft. (1989) Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke* 20: 1545-1552.

- Cottrell J. (1995a). Possible mechanisms of pharmacological neuronal protection. *J Neurosurg Anesthes.* 7 (1) 31-37.
- Cottrell JE. (1995b) Pharmacologic brain protection: specific agents. *Ann Fr Anesth Reanim*;14(1):134-141
- Crockard A, Lannotii F, Hunstock AT. (1980) Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* 11: 494-498.
- Delsoppo GJ, (1994) Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cereb Brain Metab Rev* 6(1) 47-96.
- Demopoulos H., Eugene S., Flamm. D. (1980) The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 91-119.
- Devuyst G. Bogousslavsky J. (1999) Clinical trial update: neuroprotection against acute ischemic stroke. *Curr Opin Neurol.* 12: 73-79
- Dienel GA. (1984) Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem.* 43(4):913-925.
- Diez-Tejedor E, Avendaño C, Carceller E. (1996) Fisiopatología de la isquemia cerebral: el daño isquemia-reperfusion. *Rev Clin Esp.* 196 (3): 14-19
- Dugan LL and Choi DW. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects.* 59 Edition Siegel GJ Eds. Lippincott Raven 711-731, 1994.
- Farber J., Kenneth R. (1981). The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102: 271-281.

Fernandez-Espejo E. (1996) Basic neurobiology of hippocampal formation. *Rev Neurol*. 24 (131): 779-784

Fisher M, Jonas S, Sacco RL. Prophylactic neuroprotection to improve stroke outcome. *Cerebrovasc Dis* (1994a), 4 (Suppl 4): S20-S23

Fisher M. Jones S. Sacco RL. (1994b). Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia *Stroke* 25(5): 1075-1080.

Frenkel C, Weckbecker K, Wartenberg HC, Duch DS. (1998) Blocking effects of the anaesthetic etomidate on human brain sodium channels. *Neurosci Lett* 249(2-3) : 131-134

Friederich P, Urban BW. (1997) Etomidate inhibits neuronal potassium channels in humans. *Anaesthesist*. 46(5): 434-436

Frizzell RT, Meryer YJ, Borchers J (1991) The effects of etomidate on cerebral metabolism and blood flow in a canine model for hypoperfusion. *J Neurosurg* 74: 263-269.

Gagliardi RJ (2000) Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists *Arg Neuropsiquiatr* 58(2B):583-588

Garcia JH. (1984) Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 15(1): 5-14.

Garcia SM. Cordoba RM (1999) Lo patológico y lo compensatorio en la isquemia cerebral: aspectos moleculares. *Rev Neurol* 28(8): 786-792.

Giap, Benton T. MD; Jong, Carol N. (2000). The Hippocampus: Anatomy, Pathophysiology, and Regenerative Capacity. *J Head Trauma Rehab*. 15(3):875-894.

- Ginsberg MD, Bustos R. (1989) Rodent Models of cerebral ischemia. *Stroke* 20 (12) 1627-1642.
- Ginsberg MD. (1995a) Neuroprotection in brain ischemia: an update (part I) *The Neuroscientist* 1:95-103
- Ginsberg MD. (1995b) Neuroprotection in brain ischemia: an update (part II) *The Neuroscientist* 1:164-75
- Goldszmidt A, Wityk RJ. (1998) Recent advances in stroke therapy. *Curr Opin Neurol.* 11:57-64
- Gorter JA, Petrozino JJ, Aronica EM. (1997) Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci.* 15;17(16):6179-88.
- Gozes I; Brenneman DE (2000). A new concept in the pharmacology of neuroprotection. *J Mol Neurosci* 14(1-2):61-68
- Hall E. (1992) The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 76: 13-22.
- Hallak M (1998) Effect of parenteral magnesium sulfate administration on excitatory amino acid receptors in the rat brain. *Magnes Res* 11(2): 117-131
- Hallak M, Irtenkauf SM, Cotton DB (1996) Effect of magnesium sulfate on excitatory amino acid receptors in the rat brain. I. N-methyl-D-aspartate receptor channel complex *Am J Obstet Gynecol* 175(3 Pt 1):575-81
- Hans, Pol. (2000) The role of anaesthetic agents as neuroprotective drugs. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 17 (Suppl 18):17-22.
- Harrison MJG, L Sedal, J Arnold and RW Ross Russell. (1975) No-reflow phenomenon in the cerebral circulation of the gerbil. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 38: 1190-1193.

Hass W. (1983) The cerebral ischemic cascade. *Neurologic Clinics* 1 (1) 345-349.

Heath DL, Vink R (1999) Improved motor outcome in response to magnesium therapy received up to 24 hours after traumatic diffuse axonal brain injury in rats. *J Neurosurg* 90 (3): 504-509

Heath DL, Vink R. (1999) Optimization of magnesium therapy after severe diffuse axonal brain injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 288(3): 1311-1316

Herguido MJ, Carceller F, JM Roda, C Avendaño (1999a) Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assesment. *Neuroscience* 93(1): 71-80.

Herguido MJ, F Carceller, JM Roda and C Avendaño. (1999b) Quantitative evaluation of histological damage in focal and global cerebral ischemia models. International symposium. Strategies in the use of animal models for the study of brain ischemia: a reappraisal.

Hermans C. Fransen JF. Wauquier A. (1983) Survival and neurological outcome of the Mongolian gerbil with or without bilateral carotid ligation after treatment with ether, thiopental or etomidate. *Arch Int Pharmacod Ther.* 263(2):314-316

Hickenbottom SL, Grotta J. (1998) Neuroprotective therapy. *Semin Neurol* 18(4): 485-492.

Hoffman WE, Charbel FT, Ausman JI. (1997) Cerebral blood flow and metabolic response to etomidate and ischemia. *Neurol Res* 19(1):41-44

Imdahl A, Hossmann KA ( 1986) Morphometric evaluation of post-ischemic capillary perfusion in selective vulnerable areas of gerbil brain. *Acta Neuropathol (Berl )*; 69: (3-4): 267-271

- Ironside J. (2000) Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology. *J Clin Pathol* 53(5) 405
- Jonas S. (1995) Prophylactic pharmacologic neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Ann NY Acad Sci* 15 : 21- 25.
- Kalimo H. Olsson Y. (1982) Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2 Suppl 1:S19-22.
- Kass I, Cottrell J., Geoffrey Ch. (1988) Magnesium and cobalt, not nimodipine, protect neurons against anoxic damage in the rat hippocampal slice. *Anesthesiology* 69: 710-715.
- Kenneth K. (1972) The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 22: 510-515.
- Kirino T and K. Sano. (1984a) Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropatologica (Ber)* 62: 201-208
- Kirino T and Sano K. (1984b) Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* 62: 209-218.
- Kirino T. (1982). Delayed neuronal death in gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69.
- Koorn R. Brannan TS. Martinez-Tica J. (1994) Effect of etomidate on in vivo ischemia-induced dopamine release in the corpus striatum of the rat: a study using cerebral microdialysis. *Anesth Analg.* 78(1):73-79.
- Kusumoto M, Arai H, Mori K, Sato K. (1995). Resistance to cerebral ischemia in developing gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 15(5): 886-891.

Lang LL; Heurleaux C; Dupont H. (2000) Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J Vascular Surgery* 32(1): 179-189.

Lee JM; Grabb MC; Zipfel GJ; Choi DW. (2000) Brain tissue response to ischemia. *J Clin Inv* 106 (6) 723-731

Lees KR. (2000) Neuroprotection. *Stroke* 56(2): 401-412.

Levine S. Shon D. (1969) Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Arch Path (Chicago)* 87: 315-317

Levine Seymour and H Payan. (1966). Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol.* 16: 255-262.

Levy, ML. (1998) Effects of Etomidate Administration on Cerebral Collateral Flow. *Neurosurgery.* 43(2):323

Lipton P. (1999) Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol Reviews*, 79 (4) 1431-1568

Luna LG, Manual of histologic staining methods of Armed Forces institute of Pathology. Mc Graw-Hill, New York, 1960.

Macaya A. (2000) Cell death in neonatal hypoxia-ischemia *Rev Neurol.* Oct 16-31;31(8):784-789.

Mantz J ( 1999) Neuroprotective effects of anesthetics. *Ann Fr Anesth Reanim* 18(5): 588-592

Marinov M, Harbaugh K., Hoopes P., Pikus H., Harbaugh R. (1996 ) Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 85: 117-124

Martin Lees; Sieber FE; Traystman RJ. (2000) Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptors signaling pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(1): 153-167,.

Martin R. (1995) Neuroproteccion preventiva. *Rev Neurol*; 23: 30-32

Martinez-Vila E, Egido JA, Castillo J. (1996) Tratamiento citoprotector en la isquemia cerebral. *Neurologia* 11 (Supl 3): 78-86

Martinez-Vila E, Vazquez C. (1995) Neuroprotección en isquemia cerebral. *Neurologia* 10 (Supl 2): 30-36.

Matias-Guiu, Martinez-Vila E. Isquemia cerebral y neuroprotección. Barcelona: Sintex Latino; 1988.

Matsuyama T, Matsumoto M, Fujisawa A .( 1983). Why are infant gerbils more resistant than adults to cerebral infarction after carotid ligation? *J Cereb Blood Flow Metab* 3(3): 381-5.

McCord J. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 17: 312 (3)159-163.

Mcintosh T., Vink R., Yamakami I., Faden A.I (1989) Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. *Brain Res* 482: 252-260

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA DE CIÈNCIES MÈDIQUES

- McIntosh TK Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma* 1993 Fall;10(3):215-61
- Melvin CW, Wong M, Haley E. (1990) Calcium antagonist: stroke therapy coming of age. *Stroke* 21 (3) 494-501
- Milde LN, Nilde JH. (1986) preservation of cerebral metabolites by etomidate during incomplete cerebral ischemia in dogs. *Anesthesiology*. 65(3):272-277
- Mostacero E. (1999) Neurotoxicidad, neuroprotección y ventana terapéutica en la isquemia cerebral. *Rev Neurol* 29 (6): 513-514.
- Muir KW, Lees KR (1998) Dose optimization of intravenous magnesium sulfate after acute stroke. *Stroke*. 29(5):918-923
- Muir KW, Lees KR (1995) Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26: 503-513
- Nakamura T, Minamisawa H, Katayama Y, Ueda M. (1999) Increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death. *Neuroscience* 88(1):57-67
- Neumar RW. (2000) Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 36(5):483-506
- Nishiki T, Yoshioka H, Mitsufuji N, y cols.. (1995) The effects of magnesium administration on ischemic brain injury in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metabol* 15 (suppl 1) S285.

Nitatori T, Noboru S, Waguri S. (1995) Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neuroscience* 15 (2) 1001-1011.

Odinak MM; Voznjuk IA; Yanishevsky SN. (1999). Neuroprotection for ischemia and reperfusion damage in the rat. *J Neurochem* 73 (Suppl) S202.

Palmer GC. Palmer SJ. Christie-Pope BC. Callahan AS (1985) Classification of ischemic-induced damage to Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in gerbil forebrain. Modification by therapeutic agents.. *Neuropharmacology*. 24(6):509-516

Panetta T, VL Marcheselli, P Braquet and NG Bazan. (1989) Arachidonic acid metabolism and cerebral blood flow in the normal, ischemic, and reperfused gerbil brain. *Ann NY Acad Sci* 559: 340-351

Patel P., Goskowicz R., Drummond J and Cole D. (1995) Etomidate reduces ischemia-induced glutamate release in the hippocampus in rats subjected to incomplete forebrain ischemia. *Anesth Analg* 80: 933-939

Patt A, Alden H, Harken LK, Burton T, C Rodell, Dale Piermathei. (1988) Xanthine oxidase-derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Clin Invest* 81: 1556-1562

Patt A, Rutherford RB, Pearce WH, Repine JE (1987) Cerebral ischemia-reperfusion injury in the gerbil. *J Surg Res* 42(5):462-466

Pellegrinni-Giampietro D., Cheric G., Aesiani M, Vincenzo C., Moroni F. (1990) Excitatory aminoacid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosc* 10 (3) 1035-1041

- Pizzi M, Consolandi O., Memo M., Spano P. (1996) Activation of multiple metabotropic glutamate receptor subtypes prevents NMDA-induced excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Eur J Neuros* 8: 1516-1521
- Planas AM. (1997) Alteraciones de la membrana celular y de la síntesis de proteínas en modelos experimentales de isquemia cerebral: implicaciones farmacológicas para el tratamiento de la patología isquémica. *Neurología* 12(9): 405-417
- Pulsinelli WA. (1992). Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet* 339: 533-536
- Rabin O, Drieuk., Grange E, Chang MC. (1998) Effects of EGb 761 on fatty acid reincorporation during reperfusion following ischemia in the brain of the awake gerbil hippocampus. *Neurosc* 87 (4) 817-822
- Rabin O., Michael L. (1998 ) Selective acceleration of arachidonic acid reincorporation into brain membrane phospholipid following transient ischemia in awake gerbil. *J Neurochem* 70: 325-334
- Rabin O; Drieu K, Grange E, Chong M. (1997) Acceleration of arachidonic acid reincorporation into gerbil brain membranes following ischemia. *J Neurochem* 69 (S1) S114
- Raichle M (1983) The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol* 3: 2-10
- Richardson JS (1999) Neuroprotective agents. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 10(2):447-461
- Schmidley JW. (1990) Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*; 21: 1086-90

Scremin O. (1995) Cerebral vascular system. En: The rat nervous system. Second Edition. Edited by George Paxinos, Academic Press, 3-35

Short DJ; El Masry WS; Jones PW (2000) High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord* 38(5):273-286

Siesjö BK, Agarddh CD, Bengtsson F. (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovas Brain Metab Rev*; 1: 165-211

Siesjö BK, Memezawa H, Smith ML. ( 1991) Neurocytotoxicity: pharmacological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 5: 755-67

Siesjö BK. (1992a) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: part I. Pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-84

Siesjö BK. (1992b) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: part II. Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77: 337-54

Small DL; Buchan AM. (2000) Animal models. *Stroke* 56(2) 307-317

Smith D., Keykhah M., O'Neill J., Harp J. (1989) The effects of etomidate pretreatment on cerebral high energy metabolites, lactate, and glucose during severe hypoxia in the rat. *Anesthesiology* 71: 438-443.

Traysman R., Kirsch J., Koehler R. (1991) Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71(4) 1185-1195

Sommer C. Roth SU. (2000) Metabotropic glutamate receptor subtypes are differentially expressed after transient tolerance induction in the gerbil. *Brain Res.* 872(1-2): 172-180.

Uno H, Kobayasi H, Handa Y, Kabuto M. (1999) Alterations of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in ischaemia-induced neuronal death and neuronal protection against ischaemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neurochirurgica* 141(3) 287-294.

Vink R, McIntosh TK (1990) Pharmacological and physiological effects of magnesium on experimental traumatic brain injury. *Magnes Res.* 3(3): 163-169

Warner, David S. (2000) Neuroanesthesia *Anesth Analg.* 90(5) 1238-1240

White BC; Sullivan JM; De Gracia DJ. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury *J Neurol Sci* 1;179(S 1-2):1-33

Wiebwers DO, HP Adams, JP Whisnant. (1990) Animal models of stroke: are they relevant to human disease? *Stroke* 21(1) 1-3

Wurtman RJ (1999) La neurotoxicidad en la isquemia cerebral: del laboratorio a la clinica. *Rev Neurol* 29 (6) 524-526

Yang Y. Li Q. Ahmad F. Shuaib A. (2000) Survival and histological evaluation of therapeutic window of post-ischemia treatment with magnesium sulfate in embolic stroke model of rat. *Neuroscience Lett.* 285(2):119-122

Zivin J, Grotta JC (1990) Animal stroke models. They are relevant to human disease. *Stroke* 21 (7): 981-983.