



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

CAMBIOS FUNCIONALES (CONDUCTUALES) INDUCIDOS
POR LA RESTRICCION CONTROLADA DEL FLUJO
SANGUINEO CEREBRAL EN EL RATON Y SU
MODIFICACION POR AGENTES SEROTONERGICOS

T E S I S

QUE PRESENTA:

LA M.V. ISELA RODRIGUEZ BOSCAN

PARA OPTAR POR EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA FARMACOLOGIA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCION DEL DR. RODOLFO RODRIGUEZ CARRANZA, COMO TUTOR ACADEMICO Y DE LOS DRS. HORACIO VIDRIO LOPEZ Y MIGUEL CERVANTES ALFARO COMO COASESORES, EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

DEDICATORIAS

A Dios, por ser el Todopoderoso, ya que gracias a él la vida es posible, por todas las pruebas que me ha puesto, por las ayudas recibidas y por las respuestas obtenidas en los momentos de petición.

A las A de Guasare por estar presentes en todos los actos de mi vida dándome fortaleza para luchar.

A Darwin y Darisse, quienes han soportado junto a mí estos años difíciles, ofreciendo siempre comprensión, apoyo y el amor indispensable para alcanzar las metas deseadas. Los amo.

A mi madre, quien ha sido mi fuerza en momentos de flaqueza, mi estela de luz en instantes de obscuridad y el motivo principal de mi existencia.

A la memoria de mi padre, quien con su ejemplo supo guiarme siempre hasta el último momento que estuvo a mi lado.

A mis hermanos por el cariño que siempre me han brindado.

A mis suegros, que de una u otra forma, se sacrificaron estos años, y por sus frases de comprensión y ánimos.

A nuestra familia por apoyarme y estimularme durante estos años de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodolfo Rodríguez Carranza por todo el apoyo, confianza, enseñanzas y asesorías brindadas durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Horacio Vidrio, por su valiosa ayuda, dirección y asesoría para el crecimiento y enriquecimiento del presente trabajo.

A la Dra. Martha Medina por su amistad, consejos de superación en mi formación y por su valiosa colaboración en la realización de este estudio.

Al Dr. Enrique Hong con admiración y respeto, por el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

Al Dr. Quiterio Nuñez Miranda por su ayuda y estímulos incondicionales.

A mis maestros, compañeros, amigos y trabajadores del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM, y en especial al personal técnico y administrativo del Laboratorio III, por todos los momentos que compartimos durante las fases de mi formación en la maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de superación.

A la fundación "Gran Mariscal de Ayacucho" y a la Universidad Nacional Francisco de Miranda, Venezuela, por el financiamiento otorgado para mi formación profesional.

RESUMEN

Los modelos experimentales para inducir isquemia cerebral en roedores son indispensables para investigar la fisiopatología y tratamiento de las alteraciones que ocurren por el daño tisular. Con base en esto, durante los últimos 30 años se han hecho numerosos esfuerzos para desarrollar modelos que permitan estudiar las deficiencias anatomofuncionales que se generan, los trastornos conductuales que desarrollan los animales a consecuencia del proceso isquémico, así como los efectos protectores de algunos tipos de fármacos. Entre las técnicas empleadas en las arterias de interés de este estudio se encuentran: la oclusión temporal o definitiva de las arterias carótidas comunes, ya sea en forma uní o bilateral, simultánea o secuencial con intervalo de 1 semana; comunicándose, en cada caso, diferentes porcentajes de mortalidad, lo cual probablemente está asociado a las secuelas neurológicas directas de la isquemia, variaciones anatómicas en la disposición de los vasos sanguíneos que irrigan al encéfalo, desarrollo de mecanismos compensatorios de irrigación, entre otros. En este trabajo se estudió el corte secuencial de las arterias carótidas comunes en ratones con el fin de establecer si es un modelo útil para el estudio de fármacos neuroprotectores; se exploró la utilidad del índice acumulado de mortalidad como un parámetro para estimar la letalidad provocada por la isquemia cerebral, así como la eficacia de los agonistas $5HT_{1A}$ O-OH-DPAT, buspirona e indorrenato para reducir las alteraciones conductuales y neurológicas y el índice acumulado de mortalidad de ratones sometidos a corte secuencial de las carótidas comunes. En un primer grupo de experimentos se utilizaron ratones machos adultos, 25 a 30 grs. de peso, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM y en una primera

etapa se procedió a la ligadura y corte de la arteria carótida común izquierda. Treinta y dos días después se hizo la ligadura y corte de la carótida contralateral. Una vez terminada la segunda cirugía los animales fueron observados continuamente y, en cada caso, se determinaron los trastornos conductuales y neurológicos así como el tiempo de muerte. Las evaluaciones conductuales se realizaron de acuerdo al modelo de Irwin a las 2, 24 horas y 8 días postisquemia, evidenciándose un patrón consistente en cuanto a los trastornos neurológicos en todos los animales isquémicos. La letalidad fue observada continuamente durante las primeras 24 horas postcirugía, y después cada 24 horas durante 8 días. Con el número de muertes ocurridas fue posible calcular el índice acumulado de mortalidad. Este índice fue de 0.42 (42%) a los 60 min, 0.63 (63%) a las 24 horas y de 0.92 (92%) a los 8 días. En un segundo grupo de experimentos se determinaron los efectos protectores de los agonistas 5HT_{1A}, 8-OH-DPAT, buspirona e indorrenato. Cada fármaco fue probado a tres o cuatro niveles de dosis, inyectados por vía intraperitoneal 30 minutos antes del corte de la segunda arteria carótida, y se utilizaron 24 animales por cada dosis. Se encontró que el 8-OH-DPAT disminuye en forma dosis-dependiente la mortalidad y los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas de los ratones. La actividad protectora de la buspirona fue más pronunciada con sus dosis más baja (3.1 mg/kg y más alta 31 mg/kg) que con la dosis intermedia. El indorrenato fue activo a la dosis de 1 mg/kg y su mayor protección se obtuvo con la dosis de 3.1 mg/kg. En todos los casos la máxima protección se observó durante las primeras 24 horas postcirugía. También fue evidente que la protección ofrecida por el 8-OH-DPAT a la dosis de 10 mg/kg persistió hasta el sexto día del ensayo. Estos resultados demuestran que la isquemia cerebral producida por el corte secuencial de las arterias

carótidas comunes es un modelo potencialmente útil en el estudio de fármacos neuroprotectores. El índice acumulado de mortalidad es un parámetro útil para estimar la letalidad provocada por la isquemia cerebral y para el estudio de los mecanismos que aceleran o disminuyen el desarrollo del proceso isquémico. La administración de dosis bajas y moderadas del 8-OH-DPAT, buspirona e indorrenato reduce substancialmente la mortalidad y los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas que se presentan en ratones sometidos a isquemia cerebral.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosintrifosfato
Ca ⁺⁺	Calcio
CA ₁	Zona de neuronas hipocampales tipo 1
C.C.	Carótida común
DAG	Diacilglicerol
(DMTU)	Dimetilfourea
h	Hora
ip	Vía intraperitoneal
IP ₃	Inositol 1-4-5 trifosfato
K ⁺	Potasio
(K)	Receptor kainato para ácido glutámico/aspártico
α ₁	Receptor adrenérgico tipo alfa 1
MAO	Enzima monoaminoxidasa
min	Minuto
mg/kg	Miligramo por kilogramo de peso
mRNA	RNA mensajero
Na ⁺	Sodio
Na ⁺ /Ca ⁺⁺	Intercambiador de sodio y calcio
Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa	Bomba de sodio potasio adenosintrifosfatasa

(NMDA)	Receptor N-metil-D-aspartato para el ácido glutámico/aspártico
NO	Oxido nítrico
O ₂ ⁻	Anion superóxido
(Q)	Receptor quisqualato para el ácido glutámico/aspártico
RVLM	Médula ventrolateral rostral
sc	Vía subcutánea
5HT	Serotonina
5HT _{1,2,3,4}	Tipos de receptores serotoninérgicos
5HT _{1A/1C}	Subtipos de receptores serotoninérgicos

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
1. Antecedentes generales	1
1.1. Cuadro clínico del accidente cerebrovascular	1
1.2. Patogenia del accidente cerebrovascular	2
1.2.1. Trastornos en la homeostasis de la concentración intracelular del calcio	2
1.2.2. Incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno	5
1.2.3. Aumento en la concentración extracelular de aminoácidos excitatorios y serotonina	7
1.3. Modelos experimentales para inducir la isquemia cerebral	9
1.4. Evaluación de los trastornos conductuales y neurológicos inducidos por la isquemia cerebral	12
1.5. Mecanismos farmacológicos de neuroprotección	18
1.5.1. Bloqueadores de canales de calcio	18
1.5.2. Antioxidantes y removedores de radicales de oxígeno	23
1.5.3. Inhibición de la excitación postsináptica	24
1.6. Distribución y funciones de los receptores 5HT _{1A} en el encéfalo de los mamíferos	28
1.7. Farmacología de los agonistas 5HT _{1A} (8-OH-DPAT, Indorrenato y buspirona)	30
1.8. Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos del estudio	38
II. MATERIALES Y METODOS	40
1. Animales	40
2. Ensayos preliminares	40
3. El corte secuencial de las arterias carótidas comunes	42

4.	Efectos de los agonistas serotoninérgicos 5HT _{1A} 8-OH-DPAT, buspirona e indorrenato sobre los trastornos conductuales y neurológicos e índice acumulado de mortalidad de ratones sometidos a corte secuencial de las arterias carótidas comunes	43
5.	Fármacos.....	44
6.	Análisis estadístico	45
III. RESULTADOS		46
1.	Experimentos piloto	46
2.	Trastornos conductuales y neurológicos en ratones con corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes	51
3.	El índice acumulado de mortalidad en ratones sometidos a corte secuencial de las arterias carótidas comunes	52
4.	Efectos de los agonistas 5HT _{1A} sobre los trastornos conductuales y neurológicos e índice acumulado de mortalidad de los ratones	56
IV. DISCUSION.....		61
V. CONCLUSIONES.....		68
VI. REFERENCIAS.....		70

I. INTRODUCCION

1. Antecedentes generales

El síndrome de apoplejía humana consiste en el desarrollo abrupto de una deficiencia neurológica focal, cuyo origen puede ser el indicio de la oclusión de un vaso cerebral, usualmente arterial, o la ruptura espontánea de una arteria intracranial con su consecuente hemorragia en el parénquima cerebral o el espacio subaracnoideo (García, 1984). Durante este ataque, el flujo sanguíneo al cerebro es interrumpido, lo cual de hecho interfiere con su función normal; sin embargo, se ha observado que algunas de sus áreas, denominadas zonas isquémicas de penumbra o halo ubicadas alrededor del infarto, pueden permanecer estructuralmente viables aunque metabólicamente inactivas durante horas o incluso días constituyendo las zonas potencialmente recuperables dentro del ataque isquémico.

1.1. Cuadro clínico del accidente cerebrovascular.

Las manifestaciones clínicas varían dependiendo, entre otras cosas, del área cerebral afectada, del tamaño de la lesión y la profundidad de ésta, notándose que cuando se ocluye la arteria cerebral media en su porción proximal con bloqueo de las ramas penetrantes y corticales el cuadro clínico será el de una hemiplejía y hemianestesia contralaterales, apraxia, anosognosia y disartria; si se afecta el hemisferio dominante también se producirá una afasia global. Los síndromes parciales debidos a la oclusión de una rama consisten en debilidad motora con o sin debilidad en el miembro superior (síndrome opercular

frontal).

Si la lesión afecta el territorio de la arteria cerebral anterior, el paciente podrá presentar un cuadro de abulia profunda con signos piramidales bilaterales y paraplejía, deficiencia sensitiva cortical en pie y pierna, incontinencia urinaria, rigidez paratónica, lenguaje en forma de susurros, reflejo de presión contralateral y alteración de la marcha y postura.

Por otra parte, al afectarse el territorio de la arteria cerebral posterior se observará hemianopsia homónima bilateral, ceguera cortical, acromatopsia, dislexia verbal sin agrafia, defectos de la memoria, síndrome talámico, hemiplejía contralateral, paresia de los movimientos oculares verticales, desviación divergente, miosis y ptosis de grado leve entre otros.

Finalmente, la oclusión de la arteria carótida interna producirá los mismos síntomas de la oclusión de la parte proximal de la arteria cerebral media, pudiéndose afectar además el territorio de sus ramas corticales distales (Wilson, 1981)

1.2. Patogenia del accidente cerebrovascular.

1.2.1. Trastornos en la homeostasis de la concentración intracelular del calcio

En la patogenia del accidente cerebrovascular se ha hecho énfasis sobre la relevancia de los trastornos en la homeostasis de la concentración intracelular del calcio, la cual está controlada por la regulación de varios canales de membrana, o por su liberación a partir de depósitos en organelos intracelulares como el retículo endoplásmico liso y mitocondrias; entre

los procesos de membrana tenemos los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje los cuales se abren por despolarización eléctrica de las membranas neuronales, y los canales de Ca^{++} acoplados a receptores de neurotransmisores cuya apertura obedece a la activación del receptor por acoplamiento con su neurotransmisor.

El primer sitio de ataque en los estados isquémicos cerebrales es la respiración aeróbica celular, esto es, la fosforilación oxidativa por la mitocondria. Al disminuir la presión parcial de oxígeno dentro de la célula se pierde la fosforilación oxidativa y la generación de ATP se torna lenta o cesa, lo cual tiene efectos extensos en muchos sistemas intracelulares. En particular, hay trastornos de la conservación de las membranas celulares y de la actividad de las enzimas relacionadas de la índole de las ATPasas como lo es la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, en consecuencia cambios en la permeabilidad de las membranas celulares e incremento de la concentración intracelular del Na^+ con difusión de K^+ al exterior de la célula, lo que origina la despolarización de las membranas neuronales y la apertura de los canales de calcio sensibles al voltaje (Alps, 1992); con el incremento de la concentración intracelular del calcio se genera, a su vez, la liberación masiva de neurotransmisores centrales, entre los cuales se ha dado especial importancia al ácido glutámico, aminoácido excitatorio que presenta como característica que al interactuar sobre sus receptores (NMDA) incrementa aún más la concentración intracelular del calcio por tener canales iónicos altamente permeables a este catión acoplados a su receptor.

Del mismo modo la privación de ATP se traduce en alteraciones de la regulación de la concentración intracelular del calcio a través de sus ATPasas así como por el sistema

intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. Sakamoto (1986) refiere la posible influencia de la alteración de un mecanismo de recaptación de calcio dependiente de ATP dado por el retículo endoplásmico liso y mitocondrias neuronales; señalando además que los trastornos de la bomba $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ podrían inducir la acumulación de Ca^{++} intracelular.

Por otra parte, la estimulación de los receptores β_1 adrenérgicos aumenta las concentraciones intracelulares de Ca^{++} por la activación de una fosfolipasa C aparentemente por medio de una proteína G y la hidrólisis de los polifosfoinosítidos unidos a la membrana, el resultado es la generación de dos segundos mensajeros DAG e IP3, este último estimula la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares, el cual luego inicia distintas respuestas celulares, algunas de éstas como resultado de la activación de enzimas dependientes de Ca^{++} (proteínquinas dependientes de Ca^{++} -calmodulina, proteínquina C y otras quinasas y proteasas) (Goodman, 1991).

Los efectos neurotóxicos asociados al incremento de la concentración de calcio intracelular están mediados por diversos procesos como liberación masiva de neurotransmisores, activación de proteasas y fosfolipasas permitiendo la formación de ácidos grasos libres y destrucción del citoesqueleto y estructuras membranales, la activación de endonucleasas que inducen la hidrólisis del DNA, inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial y reducción en la síntesis de ATP. La disminución del ATP celular y el aumento concomitante del AMP estimulan a una enzima, la fosfofructocinasa, lo cual origina aumento de la glucólisis anaeróbica para mantener la fuente energética de la célula al generar ATP a partir de glucógeno. La glucólisis origina acumulación de ácido láctico y fosfatos inorgánicos

por la hidrólisis de los ésteres de fosfatos lo que disminuye el pH intracelular. En esta etapa, las mitocondrias permanecen normales o están ligeramente hinchadas o condensadas, el retículo endoplásmico permanece dilatado y toda la célula está muy hinchada con aumento en la concentración de agua, sodio y cloruro y disminución de la de potasio. Todos los trastornos mencionados son reversibles si se restablece la oxigenación, en caso de persistir la isquemia hay pérdida continua de proteínas, coenzimas esenciales y ácidos ribonucleicos a través de las membranas hiperpermeables; las células pueden también perder metabolitos imprescindibles para la reconstitución del ATP, disminuyendo así el contenido neto intracelular de fosfatos de alta energía. El descenso del pH, simultáneamente con los cambios en la composición iónica de la célula, origina lesión de las membranas lisosómicas, seguida de liberación de enzimas hacia el citoplasma (RNAasas, DNAasas, proteasas, fosfatasas, glucosidasas y catepsinas) y activación de las hidrolasas ácidas. La activación de estas enzimas conlleva a la digestión enzimática de todos los componentes que se manifiesta por pérdida de ribonucleoproteínas, desoxirribonucleoproteínas y glucógeno. Por último, la célula muerta puede ser reemplazada por grandes acúmulos de fosfolípidos mismos que después son fagocitados por otras células (Bondy, 1989).

1.2.2. Incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido O_2^- , el peróxido de hidrógeno y los radicales hidróxilos, son producidos fisiológicamente en las células fagocíticas activadas, a nivel de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y a nivel de síntesis

de prostaglandinas y leucotrienos. Existen mecanismos orgánicos protectores para evitar daños celulares oxidativos que pueden ser generados por estos compuestos a los que se les ha denominado mecanismos antioxidantes; entre éstos se encuentran las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, el sistema de glutatión y las vitaminas E y C; sin embargo, en comparación con otros órganos del cuerpo, el sistema nervioso presenta una serie de características bioquímicas, fisiológicas y anatómicas que lo hacen especialmente vulnerable a los daños mediados por estas especies, tales como el hecho de tener una gran área de superficie de membrana por volumen citoplasmático, una especializada actividad de conducción neuronal y transmisión sináptica dependiente de una función eficiente de membranas, poseer una alta concentración de sustratos fácilmente oxidables, en particular ácidos grasos poliinsaturados de la membrana lipídica y un bajo nivel protectorio de enzimas antioxidantes como la catalasa y glutatión peroxidasa.

En los procesos isquémicos cerebrales se genera un estrés celular donde los mecanismos oxidantes rebasan a los antioxidantes dejando un daño potencial inducido por diversos procesos como la generación del radical superóxido O_2^- . durante la síntesis de prostaglandinas y la acumulación de neutrófilos activados con el consecuente incremento del estrés oxidativo celular, la sobreproducción de óxido nítrico el cual reacciona con el superóxido de oxígeno para formar aniones peroxinitritos, mismos que pueden formar poderosos y citotóxicos oxidantes como los radicales hidróxilos y dióxido de nitrógeno; asimismo, las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales pueden generar superóxidos como resultado de la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa,

quien bajo esta forma es un potente generador de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, mismos que mediante reacciones catalizadas por metales (hierro y cobre) producen radicales hidróxilos, los cuales son más reactivos que sus precursores. Por otra parte, la deficiencia de oxígeno puede generar la salida de radicales libres desde la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Los daños celulares consecuentes involucran peroxidación de fosfolípidos de membrana y oxidación de proteínas celulares y ácidos nucleicos (Martz, 1989; Cochrante, 1991; Evans, 1993; Palmer, 1993).

1.2.3. Aumento en la concentración extracelular de aminoácidos excitatorios y serotonina.

El glutamato y aspartato se encuentran en altas concentraciones en el encéfalo, ambos tienen efectos excitatorios muy potentes sobre las neuronas en casi todas las regiones del sistema nervioso central, esta excitación es causada por la activación de tres tipos de receptores, kainato (K), Quisqualato (Q) y N-metil-D-aspartato (NMDA). Los conductos iónicos activados por (K) y (Q) son permeables al Na^+ y K^+ , el conducto activado por NMDA es muy permeable al Ca^{++} , Na^+ y K^+ , mismo que en condiciones de isquemia cerebral se encuentra significativamente activado debido al exceso de glutamato liberado (Araki, 1993).

La participación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología del daño isquémico cerebral ha sido señalada en diversos estudios. Se ha encontrado que la 5-HT posee tanto efectos excitatorios como inhibitorios sobre la actividad de neuronas centrales mediados por múltiples subtipos de receptores 5-HT, los cuales se encuentran heterogéneamente distribuidos

dentro del sistema nervioso central. Estudios electrofisiológicos han revelado que la 5-HT es capaz de despolarizar neuronas centrales actuando sobre receptores 5-HT_{2/1C}, 5-HT₃ ó 5-HT₄; ocurriendo hiperpolarización neuronal al interactuar con receptores 5-HT_{1A}.

Durante la isquemia la falta de energía y la despolarización de la membrana probablemente promueven el aumento en la concentración extracelular de serotonina por incremento en el flujo presináptico, vía activación de canales de calcio sensibles a voltaje, y por la atenuación de la actividad de la MAO, dejando una reducción de la desaminación oxidativa. Una fuente adicional que podría contribuir a elevar los niveles incluye la pérdida de serotonina plasmática a través de la disfuncionalidad de las barreras de los vasos sanguíneos cerebrales; además, las plaquetas activadas podrían proveer una fuente adicional.

Los efectos dañinos de la serotonina pueden ser neuronales y vasculares. La serotonina tiene un efecto potenciador sobre la excitación neuronal por glutamato en diferentes regiones del cerebro, con altas concentraciones produce despolarización de las neuronas motoras por activación de receptores 5-HT₂. En la neocorteza la serotonina aumenta el efecto de aminoácidos excitatorios como el ácido glutámico sobre sus receptores NMDA y (Q).

Además de su actividad neuromoduladora, la serotonina es un vasoconstrictor potente, efecto mediado por la activación de receptores 5-HT₂, el cual se ve aumentado durante la isquemia y recirculación debido al daño del endotelio de los vasos sanguíneos cerebrales. La participación de la serotonina en los mecanismos termorreguladores también se ha estudiado en relación a los subtipos de receptores, se ha encontrado que en la rata la activación de receptores 5-HT₁ genera hipotermia mientras que la estimulación de receptores

5-HT₂ produce hipotermia.

Recientemente ha sido demostrado que la serotonina estimula la liberación de ácido araquidónico e inositol fosfato en neuronas hipocámpales mediado por receptores 5-HT₂; por lo tanto, el efecto deletéreo de la serotonina puede ser mediado potencialmente a través de la generación de ácido araquidónico y sus eicosanoides (Gudelsky, 1986; Davies, 1987; Guido, 1988; Sheldon, 1990; Prehn, 1993).

1.3. Modelos experimentales para inducir la isquemia cerebral.

Durante los últimos 30 años se han hecho numerosos esfuerzos para desarrollar modelos experimentales de isquemia cerebral en roedores, con el propósito de estudiar las deficiencias anatomofuncionales que se generan, los trastornos conductuales que desarrollan los animales a consecuencia del proceso isquémico, así como los efectos protectores de algunos tipos de fármacos. En general, dichos modelos pueden ser clasificados en isquemias focales y globales. La isquemia focal resulta de la oclusión de una arteria que vasculariza una región particular del encéfalo como lo es la oclusión de la arteria cerebral media; esta técnica ha sido muy utilizada en ratas y gerbil, y puede efectuarse en forma temporal o permanente. La primera implica la introducción de un monofilamento de nylon a través de la arteria carótida interna hasta llegar a bloquear el origen de la arteria cerebral media durante un período de 2 horas (Chen, 1992; Zhang, 1993), este procedimiento tiene la ventaja de que no requiere de una craneotomía subtemporal; sin embargo, se producen daños mecánicos en los vasos sanguíneos. Para la oclusión permanente de la arteria cerebral media se han

comunicado diversas técnicas, entre éstas tenemos: a. La cauterización de dicho vaso a nivel de su origen (Bederson, 1986; Shiino, 1989; Barone, 1991; Morikawa, 1992), para tal fin es necesario realizar una craneotomía lo que podría causar daños tisulares en las áreas adyacentes al sitio de la oclusión; b. La inyección de microesferas a través de la arteria carótida interna para simular una microembolización (Demura, 1993), que en efecto se produce, pero los infartos se distribuyen heterogeneamente en el cerebro; c. La oclusión fototrombótica de la arteria cerebral media, que consiste en la generación de un trombo mediante la interacción fotoquímica entre la luz laser y una sustancia fotosensible que es inyectada en forma endovenosa (Markgraf, 1994), esta técnica evita la realización de una craneotomía subtemporal y los daños mecánicos en los vasos sanguíneos observados con las técnicas anteriores, pese a esto, su procedimiento resulta muy costoso.

La isquemia global se produce cuando se ocluye una o varias de las arterias extracraneales que vascularizan al encéfalo, usualmente en forma transitoria, lo que afecta diversas áreas cerebrales aunque principalmente a regiones selectivamente vulnerables a los procesos isquémicos que incluyen a las neuronas CA1 hipocámpales, caudoputamen y neocorteza (Milesón, 1991; Hossman, 1993). En un buen número de modelos se produce este tipo de isquemia cerebral a través de la manipulación de las arterias carótidas comunes. De ellos, cabe destacar:

a. La ligadura y corte unilateral de la arteria carótida común en gerbil comunicada por Levine (1969) donde se refiere una mortalidad del 18% de los gerbil infantes al primer día de la oclusión y del 35% durante la primera semana postcirugía en el caso de los animales adultos.

Kahn (1972) la efectuó en gerbil adultos señalando un 53% de mortalidad dentro de los primeros 5 días postisquemia, destacando además que los animales sobrevivientes no presentaron infarto cerebral.

b. La oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes en forma temporal. En este caso la oclusión se realiza mediante el pinzamiento simultáneo de las arterias carótidas con unas micropinzas, por un período de tiempo determinado, permitiéndose posteriormente el reflujo sanguíneo. En cuanto a los tiempos de oclusión considerados se reportan períodos entre 5 y 20 minutos en gerbil (Kirino, 1984; Crain, 1988; Gerhardt, 1988; Wang, 1990; Akai, 1993), comunicando incrementos en la actividad locomotora de los animales y daños celulares a nivel del hipocampo. También se ha utilizado en ratas con un tiempo de oclusión de 30 minutos (Yoshida, 1986).

c. La ligadura bilateral simultánea de las arterias carótidas comunes en forma permanente. Se ha realizado en gerbil (Harrison, 1973), donde se comunica una mortalidad de los animales del 65% durante las primeras 24 horas postisquemia y trastornos neurológicos caracterizados por movimientos en círculo en los sobrevivientes. Fujishima (1976) utilizando cepas de ratas hipertensas y normotensas comunicó una mortalidad de 72-73% de las ratas hipertensas y de 11-25% en el caso de las normotensas en las primeras 24 horas postcirugía. Del mismo modo Lehman (1991) señala 51% de mortalidad en conejos y la ausencia de trastornos neurológicos en los animales sobrevivientes.

d. La isquemia repetitiva por la oclusión bilateral temporal de las carótidas comunes en forma simultánea en gerbil. En este caso la isquemia se produce por el pinzamiento simultáneo de

las arterias carótidas comunes por 3 minutos permitiendo a continuación la reperfusión sanguínea por un período de una hora; al cabo de este tiempo, los animales vuelven a ser sometidos al procedimiento descrito. No se reportan datos de mortalidad y se ha comunicado que en algunos casos los animales presentaron hiperactividad y encorvamiento del dorso durante los primeros 30 minutos postisquemia (Shuaib, 1992; McCrea, 1994).

c. La ligadura bilateral permanente de las arterias carótidas comunes en forma secuencial. Este método implica en primer término la ligadura permanente de la arteria carótida común izquierda, posterior a una semana se realiza el mismo procedimiento a la arteria carótida contralateral. Esta técnica se ha utilizado en cepas de ratas hipertensas y aunque no se reportan datos de mortalidad de los animales se ha referido que se logra aumentar la resistencia de las ratas a la segunda ligadura, incrementándose la sobrevivencia, probablemente por un efecto acumulado del estrés de los procesos inducidos con la primera ligadura (Horie, 1993).

1.4. Evaluación de los trastornos conductuales y neurológicos inducidos por la isquemia cerebral.

Se han empleado numerosos procedimientos. De ellos cabe destacar:

a. El registro de la actividad locomotora por medio de cajas de campo abierto (Wang, 1990; Coberth, 1990) que consiste en medir el desplazamiento de los animales dentro de unas cajas de madera cuyo piso se encuentra dividido en varios cuadros de aproximadamente 12 x 12 cm. El aparato tiene incorporado un sistema localizador de imágenes capaz de ubicar la

posición de los animales mediante el registro del número de veces que el animal entra en un cuadrante determinado. Wang (1990) utilizó este procedimiento en gerbil sometidos a la oclusión bilateral simultánea de las arterias carótidas comunes; realizó evaluaciones de 10 minutos al día durante 10 días consecutivos y señala incrementos de la actividad locomotora de los gerbil de casi el doble de los observados en sus controles, estos incrementos fueron máximos a las 24 horas postoclusión disminuyendo progresivamente para estabilizarse al séptimo día del ensayo y estuvieron relacionados con daños severos a nivel de las neuronas hipocámpales CA1.

Una modificación a la sensibilidad del registro de las mediciones obtenidas con las cajas de campo abierto son las cajas o cámaras de actividad fotoeléctrica cuyo principio básico sigue siendo el poder determinar la actividad ambulatoria de los animales en un área determinada. En este caso el aparato posee un sistema de 8 rayos infrarrojos alineados de manera horizontal en cada lado de la cámara, los cuales están ubicados a 2.5 cm de distancia del nivel del piso y separados entre sí por la misma distancia, además cuenta con un procesador central computarizado que realiza tabulaciones de los diversos patrones de desplazamiento de los animales, lo que permite comparar el patrón de movimientos que realizan los animales una vez inducida la isquemia con los obtenidos en los ensayos de acondicionamiento. En diversos estudios conductuales se ha reportado la utilidad de este método, así por ejemplo Mileson (1991) comunica un incremento, de hasta 3 veces, de las distancias recorridas por los gerbil sometidos a la oclusión temporal de las carótidas comunes; esta hiperactividad fue máxima a las 24 horas postisquemia y se estabilizó al quinto día de

las evaluaciones. Del mismo modo a lo descrito por Wang (1990) estas alteraciones se correlacionaron con daños severos a nivel del hipocampo.

b. La evaluación neurológica clasificada en cuatro grados. La cual comprende una escala de 4 grados para jerarquizar los cambios conductuales motores que se generan posterior a la oclusión del flujo sanguíneo cerebral; así tenemos que en el grado 0 (cero) se incluyen todos los animales que estando sujetos por la cola extienden normalmente ambos miembros anteriores hacia el piso; el grado 1 implica los animales que flexionan el miembro anterior contralateral al hemisferio cerebral injuriado, comprendiendo desde una flexión moderada de la muñeca con adducción del hombro y extensión del codo a una postura severa con la muñeca y el codo totalmente flexionados y adducción con rotación interna del hombro; el grado 2 involucra aquellos animales que al aplicarles una suave presión por detrás de la articulación del hombro no ofrecen o está disminuida la resistencia al empuje lateral y el miembro puede ser desplazado sin dificultad; y en el grado 3 se encuentran aquellos animales que tomados por la cola realizan movimientos en forma de círculo y de manera consistente hacia el lado parético. Este modelo ha sido utilizado en ratas con oclusión permanente de la arteria cerebral media por coagulación microbipolar (Bederson, 1986), señalando que la severidad de las deficiencias neurológicas dependen de la ubicación de la oclusión, observando que cuando se ocluye la arteria cerebral media desde su origen hasta el nivel de la vena cerebral inferior se presentan deficiencias neurológicas severas caracterizadas por disturbios motores que incluyen hemiparesis.

El modelo de la evaluación del estado neurológico de los animales comunicado por

Menzies (1992) constituye una modificación del procedimiento de evaluación descrito por Bederson (1986) donde se aprecia una escala de 5 grados de evaluación; este último sugiere incluir en el grado 3 a aquellos animales que sujetos por la cola realicen movimientos espontáneos en todas direcciones realizándolo en forma monodireccional hacia el lado parético sólo cuando se le aplica un suave jalón de la cola, mientras que el grado 4 incluye a los animales que espontáneamente se desplazan con movimientos en forma de círculo hacia el lado parético. Este modelo también ha sido utilizado en ratas con cauterización de la arteria cerebral media, coincidiendo con lo comunicado por Bederson (1986) de que la intensidad de los trastornos neurológicos está en función de la localización y extensión de la oclusión, aduciendo que la existencia de un grado 3 intermedio incrementa la susceptibilidad de la técnica para predecir el tamaño del área de infarto.

c. La batería sensorimotora (Green, 1992; Markgraf, 1994). Este procedimiento implica la valoración de los trastornos conductuales y neurológicos inducidos por la isquemia cerebral mediante la combinación de una serie de ensayos que han sido utilizados en forma separada por algunos investigadores. En general comprende:

1. Evaluación de los reflejos posturales, el cual consiste en mantener al animal suspendido por la cola a 1 metro sobre el nivel del piso para observar en primer término la posición de los miembros anteriores. Aquellos animales que extienden normalmente ambos miembros anteriores hacia el piso son clasificados en el grado cero. Se consideran comportamientos anormales si se observa flexión de los miembros o rotación del cuerpo, y en tal caso se procede a colocar el animal sobre una superficie suave de papel o plástico que pueda ser

agarrada por las manos del animal, y en esta posición se le aplica una ligera presión por detrás de la articulación de los hombros para tratar de desplazar los miembros anteriores hacia adelante. Si el animal ofrece resistencia al deslizamiento se clasifica como grado 1, si por el contrario no se resiste se cataloga como grado 2.

2. Evaluación de la integración sensorial-motora. Consiste en evaluar la manera como los animales colocan sus miembros anteriores en respuesta a tres tipos de estímulos (visual, táctil y propioceptivo). Para la respuesta al estímulo visual el animal es suspendido a 10 cm sobre el nivel de la superficie de una mesa, permitiéndole el libre movimiento de sus miembros anteriores; si el animal está normal extenderá ambos miembros para tratar de alcanzar su superficie. La evaluación al estímulo táctil se realiza permitiendo un ligero contacto de la superficie dorsal y lateral del miembro del animal con el borde de la mesa. Los animales normales responden colocando su miembro sobre la superficie de la mesa en forma inmediata, mientras que en los lesionados la respuesta es lenta o no se presenta. En el caso de la evaluación al estímulo propioceptivo se empuja el miembro anterior del animal contra el borde de la mesa a fin de provocar la estimulación muscular, observándose que si el animal no está lesionado colocará inmediatamente su miembro sobre la mesa, o en caso contrario permitirá la presión. Para cada prueba la calificación se hace en escala del cero al dos; cero si los animales responden al estímulo en forma inmediata y normal, 1 si la respuesta fue ligera y demorada y 2 si no se observa respuesta. El total de puntos se obtiene de la sumatoria de los obtenidos en cada ensayo.

3. Evaluación de la fuerza muscular. Los animales son colocados en un biombo que se

encuentra ubicado en posición horizontal, para ser rotado a la posición vertical en un tiempo de dos segundos. Los animales son evaluados durante 5 segundos para determinar su permanencia en el aparato. Los animales normales se sujetaran al biombo durante los 5 segundos de la prueba; si el animal se desliza pero no se cae recibirá una calificación de 0.5 puntos; si se cae dentro de los 5 segundos del ensayo su calificación será de 1 punto, y si cae inmediatamente obtendrá 2 puntos.

4. Evaluación de las fallas en el desplazamiento. Esta prueba consiste en hacer caminar a los animales sobre una rejilla de 30 cm² que se encuentra suspendida por un período de 2 minutos. Se considera como falla cada vez que el animal introduce algunos de sus miembros en las aberturas de la rejilla y el número total de fallas se expresa como un porcentaje del total de número de pisadas.

5. Prueba del laberinto en agua. El aparato de laberinto consiste de una piscina redonda (122 cm de diámetro y 60 cm de profundidad) dividida en cuatro cuadrantes que representan los puntos de entrada a la misma. Para la realización de la prueba la piscina se llena con agua turbia, por la adición de pintura blanca, a 21°C y se le coloca una plataforma redonda a 2 cm por debajo de la superficie del agua; se introduce el animal, seleccionando una de las puertas por cada ensayo, y sus movimientos son registrados y analizados por un sistema microcomputarizado. Se calcula la latencia del animal para alcanzar la plataforma en segundos así como la longitud recorrida en cm y se estima el promedio de la rapidez del nado.

d. Evaluación por el perfil neurofarmacológico (Irwin, 1964). Este método se fundamenta

en la observación y manipulación de los animales en forma directa y sistemática, lo que permite cuantificar, en grados, la intensidad de los efectos del ataque isquémico sobre los patrones conductuales, neurológicos y autonómicos normales. Entre los parámetros a valorar se encuentran: la actividad espontánea y exploratoria, el estado de alerta, estereotipia, coordinación motora, pasividad, excitabilidad motora al manejo, catatonía, catalepsia, tono y fuerza muscular, temperatura corporal apertura palpebral y diámetro pupilar entre otros.

1.5. Mecanismos farmacológicos de neuroprotección.

El objetivo terapéutico tras un accidente cerebrovascular consiste básicamente en reducir al mínimo las alteraciones secundarias que se suceden; dicho objetivo persigue proteger el parénquima cerebral normal e isquémico de una serie de procesos patológicos iniciales o recidivantes, así como de los efectos secundarios del ataque en sí; por ejemplo, compresión cerebral por hemorragia o edema intra craneal. Durante las últimas décadas los efectos neuroprotectores de diversos fármacos han sido objeto de numerosas investigaciones. El efecto protector se ha logrado a través de diversos mecanismos.

1.5.1. Bloqueadores de canales de calcio.

Los antagonistas de los canales de calcio activados por voltaje, del tipo de las dihidropiridinas, actúan sobre los canales tipo L con poca actividad sobre los canales N y T. La nimodipina es uno de los fármacos más estudiados dentro de este grupo y se ha encontrado que produce efectos selectivos sobre los vasos sanguíneos cerebrales a dosis insuficientes para

afectar la presión sanguínea arterial sistémica (Kazda, 1982). Los efectos benéficos de la nimodipina sobre el flujo sanguíneo cerebral han sido medidos en varios modelos de isquemia global (Steen, 1984) y focal (Mohamed, 1985), mismos que han sido atribuidos a la acción vasodilatadora del fármaco. No obstante, Spedding (1985) señala la existencia de sitios de unión específicos a dihidropiridinas, representados por canales de calcio tipo L, en neuronas selectivamente vulnerables a los daños postisquémicos como las CA₁, hipocámpales y corteza cerebral. Asimismo, Nuglish (1990) y Welsh (1990) demostraron disminuciones en los daños celulares de neuronas CA₁, hipocámpales a los 7 días postisquemia en ratas pretratadas con nimodipina, señalando que tales efectos fueron independientes de su acción vasodilatadora, sugiriendo que la protección probablemente estuvo mediada por una acción directa del fármaco sobre las neuronas hipocámpales, por medio del bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje.

El efecto neuroprotector de la nimodipina también ha sido demostrado en modelos *in vitro* de neurotoxicidad inducida por glutamato, observándose incrementos en la viabilidad de las neuronas cultivadas cuando el fármaco fue aplicado posterior a la exposición a glutamato (Kriegstein, 1991). Además Karler (1991) observa que el tratamiento con antagonistas de calcio como el diltiazem, verapamil y nifedipina podía inhibir las convulsiones inducidas por la activación de receptores NMDA y kainato en ratones; indicando que los antagonistas de calcio también podrían ser efectivos en la prevención de las alteraciones causadas por la actividad de aminoácidos excitatorios.

El perfil farmacológico de los antagonistas de calcio del tipo de las fenilalquilaminas,

como la flunarizina difiere de la nimodipina. Estos no son tan activos como las dihidropiridinas para bloquear los canales de calcio tipo L bajo condiciones terapéuticas y se sabe que reducen la concentración del calcio intracelular porque inhiben la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Holmes, 1984). Los efectos neuronales de este tipo de fármacos han sido señalados en varios estudios, reportándose que la flunarizina administrada postisquémicamente reduce la necrosis neuronal en el hipocampo en ratas (Deshpande, 1985). Tales hallazgos fueron avalados por Beck (1988) quien demuestra que la neuroprotección es independiente del efecto vasodilatador del fármaco. Por otra parte, Takahashi (1991) señala que la flunarizina actúa como un bloqueador de la entrada de Na^+ y Ca^{++} en las neuronas del sistema nervioso central a través de canales de calcio tipo T; estos canales juegan un papel importante debido a que contribuyen en la generación de las ondas despolarizantes espontáneas que repercuten en la excitación cerebral y en consecuencia podrían estar asociados a la neurotoxicidad mediada por Ca^{++} y liberación de aminoácidos excitatorios.

Los antagonistas competitivos de los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) incluyen a una serie de análogos estructurales del ácido L-glutámico que poseen acciones antagonistas potentes al unirse a los sitios de fijación que posee el ácido glutámico sobre sus receptores ionotrópicos NMDA. En este grupo se encuentran los compuestos AP5, AP7, APV y CPP entre otros. Sin embargo, la eficacia farmacológica de muchas de estas sustancias y sus derivados es limitada debido a su naturaleza hidrofílica, lo cual hace insuficiente su paso a través de la barrera hematoencefálica.

En cuanto a los antagonistas no competitivos de los receptores NMDA, no interfieren

con el mismo sitio de unión del ácido glutámico, sino con sitios de reconocimiento específicos dentro del canal de calcio activado o con sitios de unión adyacentes, y por lo tanto modifican la actividad del receptor de glutamato y por ende el flujo iónico. Fenciclidina (PCP), es una de las primeras sustancias caracterizadas dentro de este grupo, la cual se fija específicamente a los sitios de unión a PCP (Fagg, 1987). Entre otras sustancias con afinidad por estos sitios de unión se ha señalado a la ketamina y la dizocilpina (Kriegstein, 1986). La acción antagonista sobre los receptores NMDA es dependiente de voltaje y disminuye con la despolarización. Adicionalmente, esta clase de fármacos actúa dentro de porciones específicas del canal de calcio operado por el receptor, y su unión es dependiente de la frecuencia de apertura del mismo; de tal modo que el desarrollo de la actividad antagonista se acelera por la presencia del agonista, el cual induce la activación del canal (MacDonald, 1987). Todos los compuestos con afinidad sobre los sitios PCP son lo suficientemente lipofílicos para penetrar la barrera hematoencefálica en concentraciones farmacológicamente efectivas para proporcionar actividad neuroprotectora en varios modelos de isquemia/hipoxia cerebral (Goldberg, 1987; Swan, 1988; Ahlemeyer, 1989; Demerle-Pallardy, 1991; Gill, 1991; Bielenberg, 1991). Pese a esto, también se ha comunicado que dichos fármacos no producen neuroprotección (Wieloch, 1989; McDonald, 1990; Buchan, 1991).

Otro grupo de antagonistas no competitivos de los receptores NMDA está representado por algunas sustancias que interactúan con el sitio de unión que posee la glicina sobre el complejo receptor NMDA, entre éstos se encuentran los derivados del ácido kinurénico como la cicloleucina. La inhibición competitiva de los sitios de unión a la glicina reduce la

actividad de los canales de calcio operados por receptor y la vulnerabilidad neuronal (Patel, 1990; Gill, 1990). Desafortunadamente los antagonistas de glicina disponibles son sustancias polares y, por lo tanto, su paso a través de la barrera hematoencefálica es limitado.

El incremento en la concentración de glutamato observado en los estados de isquemia cerebral produce degeneración neuronal no sólo por la activación de receptores NMDA, sino también por la estimulación de receptores no-NMDA (AMPA/quisqualato y kainato). En tal sentido, Honoré (1988) ha desarrollado una serie de quinoxalindionas, por ejemplo, CNQX y DNQX, que antagonizan en forma competitiva a los receptores de glutamato sensibles a AMPA y kainato, con efectos antagonísticos moderados o débiles sobre los sitios de unión a la glicina. El compuesto NBQX, caracterizado por su alta afinidad sobre los receptores AMPA, ha demostrado efectos neuroprotectores en gerbils sometidos a 5 minutos de isquemia cerebral, aún cuando el fármaco fue administrado 2 horas posterior a la reperusión vascular (Sheardown, 1990). Resultados comparables fueron obtenidos por Kriegstein (1991), quien señala que el tratamiento postisquémico con NBQX reduce la degeneración neuronal que se observa posterior a la isquemia global y focal en la rata. Como mecanismos de acción de estos fármacos se ha propuesto que son capaces de inducir el bloqueo del receptor ionotrópico AMPA inhibiendo así el influjo de Na^+ a través del canal acoplado a este receptor y la despolarización consecuente y apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje, así como la activación de los canales operados por receptor del tipo NMDA. De tal modo que el bloqueo del receptor AMPA reduce, indirectamente, el influjo de calcio vía canales de calcio operados por receptor y canales de calcio sensibles a voltaje.

1.5.2. Antioxidantes y removedores de radicales de oxígeno.

La efectividad de algunos compuestos sintéticos para prevenir los daños celulares inducidos por la generación de radicales de oxígeno es una alternativa para el tratamiento de los estados isquémicos cerebrales. La dimetilgliourea, removedor de radicales hidroxilos, y el alopurinol, inhibidor de la enzima xantina oxidasa, son los fármacos más estudiados dentro de este grupo, y han demostrado actividad neuroprotectora en diversos estudios de isquemia cerebral, comunicándose además que son capaces de disminuir el daño cerebral por reducir el edema tisular y funcionar como quelante de metales transitorios respectivamente (Martz, 1989; Williams, 1992; Araki, 1993; Kiyota, 1993).

Otro tipo de compuestos dentro de esta clasificación son los 21 aminoesteroides, los cuales han sido desarrollados para el tratamiento de lesiones tipo traumáticas y/o procesos de isquemia cerebral. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la peroxidación de lípidos dada su localización específica dentro de las membranas celulares. Las primeras evidencias experimentales de los efectos neuroprotectores de este tipo de fármacos, en particular U-74006 F fueron comunicadas por Hall (1990) quien reporta que el fármaco es efectivo para atenuar los daños tisulares postisquémicos, particularmente en modelos de isquemia focal con reperusión. En modelos de isquemia global los resultados han sido contradictorios, encontrando mayor efectividad de la sustancia en gerbil y perros que en ratas. Además de su mecanismo de protección a nivel de las membranas celulares, estos fármacos contribuyen en el mantenimiento de los procesos celulares responsables de revertir la acumulación del calcio intracelular que se induce por la isquemia cerebral; efectos que son

independientes de los cambios en el flujo sanguíneo cerebral. Por otra parte, los 21 aminoesteroides atenúan la liberación de radicales libres de los leucocitos activados, y estabilizan los efectos sobre membranas celulares lesionadas.

1.5.3. Inhibición de la excitación postsináptica.

a. Agonistas serotoninérgicos $5HT_{1A}$.

La estimulación de los receptores serotoninérgicos_{1A} ($5HT_{1A}$) contribuye a dar neuroprotección debido a que producen hiperpolarización de la membrana neuronal por un incremento en la conductancia al K^+ . La entrada de potasio a la neurona causa su hiperpolarización asociada con una disminución en la resistencia de entrada, permitiendo en consecuencia un incremento en el umbral de disparo y la menor posibilidad de descarga de la célula neuronal. También se ha comunicado que el efecto protector de este tipo de fármacos obedece a un mecanismo de control de la liberación de la serotonina que se observa durante la isquemia por la estimulación de autorreceptores de las neuronas del núcleo dorsal del rafe; los cuerpos celulares de estas neuronas se proyectan a la neocorteza e hipocampo, de tal modo que su activación disminuye la liberación del neurotransmisor y por ende la posibilidad de sus efectos excitatorios inducidos por la activación de otros tipos de receptores como los $5HT_2$. Así los agonistas $5HT_{1A}$ inducen neuroprotección sobre regiones corticales posterior a la isquemia cerebral focal aunque la densidad de este tipo de receptores es baja en la neocorteza.

A la fecha varios agonistas $5HT_{1A}$ han sido evaluados por su actividad neuroprotectora

en modelos experimentales de isquemia cerebral, encontrándose efectos benéficos. Bielenberg (1990) argumentó que tal mecanismo podría proveer un nuevo principio terapéutico para el tratamiento de la isquemia cerebral comunicando resultados que demuestran que los agonistas $5HT_{1A}$, 8-OH-DPAT, buspirona, gepirona e ipsapirona poseen actividad neuroprotectora, ya que reducen significativamente el tamaño del área del infarto que se genera en la isquemia cerebral focal de ratas y ratones. Bode-Greuel (1990) reportó que ipsapirona y BAYR 1531 (6-methoxy-4 di-n-propylamino-1,3,4,5 tetrahydrobenz. (c. d) indole) producen neuroprotección en un modelo de isquemia cerebral global en gerbil.

Prelm (1991) en un estudio para valorar las propiedades neuroprotectoras de varios agonistas $5HT_{1A}$ en modelos de isquemia cerebral focal y global, comunicó que los agonistas CM57493 y urapidil ofrecieron efectos protectores en el mismo orden de magnitud que los producidos por los antagonistas de los receptores NMDA y fenciclidina, en el modelo de isquemia cerebral focal permanente en ratones, mientras que la neuroprotección observada con el CM57493 fue confirmada tanto en modelos de isquemia focal permanente como temporal en ratas. Por otra parte, Prelm (1993) comunica que los agonistas $5HT_{1A}$ fueron capaces de reducir las lesiones tisulares observadas en la neocorteza de ratones con isquemia focal permanente. Asimismo, Piera (1995) indica que el 8-OH-DPAT (1 y 3 mg/kg ip) protege significativamente la zona CA1 hipocampal de gerbil sometidos a isquemia global temporal.

b. Agonistas de los receptores de adenosina (A_1).

La activación de los receptores de adenosina (A_1) reduce el influjo de calcio neuronal por limitar la despolarización de las membranas celulares y en consecuencia reducen la

apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje. Asimismo se ha observado que la adenosina es capaz de controlar el influjo de calcio mediado por la activación de los receptores NMDA (Fredholm, 1988). Este efecto estabilizante de membranas previene los eventos secundarios de la activación patológica de los canales de calcio operados por receptor.

De manera similar a la serotonina, la adenosina produce la hiperpolarización de la membrana neuronal debido a un incremento en la conductancia al K^+ previniendo, en consecuencia, la descarga celular y la generación de los daños. Además la adenosina activa una conductancia al Cl^- , la cual es dependiente de voltaje facilitando la salida del anión acumulado a nivel intracelular y en consecuencia el efecto estabilizante de membranas (Mager, 1990). También se ha sugerido que la modulación de las conductancias al potasio y cloro activadas por la adenosina están acopladas a proteínas G y sujetas a regulación metabólica (Wasserkort, 1991). Una de las sustancias más estudiadas dentro de este campo es la vimpocetina, la cual ha demostrado efectos benéficos en una serie de enfermedades cerebrovasculares que se acompañan con hipoxia e isquemia (Otomo, 1985). En varios modelos de isquemia cerebral dicha sustancia ha demostrado reducciones en el tamaño del área de infarto; así por ejemplo la administración intraperitoneal de la vimpocetina ofreció protección de las neuronas hipocámpales contra los daños isquémicos en ratas con oclusión bilateral simultánea de las arterias carótidas comunes en combinación con hipotensión (Rischke, 1991).

Los efectos neuroprotectores del pretratamiento con propentofilina (HWA 285) sobre las neuronas hipocámpales también han sido demostrados en modelos de isquemia cerebral

en gerbil (DeLeo, 1987), este compuesto inhibe el recambio de adenosina incrementando su concentración extracelular (Fredholm, 1986); además se ha observado que la propentofilina es capaz de reducir la concentración extracelular de glutamato y reduce la adhesión plaquetaria a las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales facilitando el flujo sanguíneo (Hagberg, 1990).

c. Antagonistas serotoninérgicos 5HT₂.

Estudios neurofisiológicos sugieren que la activación de los receptores serotoninérgicos 5HT₂ pueden mediar la acción excitatoria de la serotonina sobre las neuronas centrales; la activación de este tipo de receptores induce el cierre de los canales de K⁺ (North, 1989), lo cual contribuye a la despolarización de la membrana celular con el consecuente incremento de la excitabilidad neuronal. Las evidencias demuestran que las concentraciones elevadas de serotonina despolariza neuronas motoras por la activación de receptores 5HT₂ (White, 1983); la aplicación iontoforética o tópica de serotonina en rebanadas de neocorteza de gatos indujo la potenciación de la actividad de aminoácidos excitatorios (Nedergaard, 1987). Estos resultados sugieren que el efecto protector de los antagonistas 5HT₂ podría involucrar la reducción de los procesos excitotóxicos inducidos por glutamato. Sin embargo, la distribución de los receptores 5HT₂ en el hipocampo de ratas, tal como en el humano, indica que la densidad de éstos es relativamente baja en las células CA1 hipocámpales en comparación con la corteza (Hoyer, 1986), lo que disminuye la probabilidad de que los efectos benéficos de los antagonistas 5HT₂ estén mediados por su acción directa sobre neuronas CA1. Interesantemente, la corteza entorrinal posee concentraciones mayores de los receptores 5HT₂,

y dado que la principal aferencia excitatoria del hipocampo proviene de la corteza entorrinal se ha propuesto que la ritanserina, ketanserina, naftidrofuryl y emopamil ejercen sus efectos neuroprotectores por depresión de las eferentes excitatorias de la corteza entorrinal (Nakayama, 1988; Fujikura, 1989). Además de sus actividades neuromoduladoras la serotonina es un vasoconstrictor potente; debido a este efecto su liberación durante el proceso isquémico disminuye el flujo sanguíneo cerebral incrementando los daños neuronales, mismos que se acentúan en el proceso de reperfusión sanguínea debido a daños en el endotelio vascular. Estos efectos vasoconstrictores de la serotonina están mediados por la activación de los receptores $5HT_2$ (Wiernsperger, 1990), en tal sentido se ha sugerido que el efecto protector de la ritanserina involucra el bloqueo de los receptores $5HT_2$ localizados en los vasos sanguíneos cerebrales lo que atenúa la reducción del flujo sanguíneo inducida por la misma liberación de la serotonina en el proceso isquémico. En apoyo a esta hipótesis, también se ha demostrado que la ketanserina previene la disminución del flujo sanguíneo que se observa en áreas corticales remotas al infarto trombótico (Dietrich, 1989).

1.6. Distribución y funciones de los receptores $5HT_{1A}$ en el encéfalo de los mamíferos.

Los receptores $5HT_{1A}$ se encuentran ubicados en diversas áreas cerebrales de las especies mamíferas, incluyendo al hombre, particularmente a nivel de la formación hipocámpal (CA1 - CA3, giro dentado, corteza entorrinal, núcleo dorsal del rafe y núcleo septal lateral) (Hoyer, 1986; Pazos, 1987; Radja, 1991). Estas regiones, en su mayoría, son componentes del sistema límbico lo que sugiere que la modulación de los mecanismos

emocionales podría estar dada por este tipo de receptores (Iversen, 1984). Asimismo, la presencia de los receptores $5HT_{1A}$ en el núcleo dorsal del rafe indica que la serotonina es capaz de modular la actividad de neuronas serotoninérgicas. La expresión de los receptores $5HT_{1A}$ también se ha señalado en la neocorteza, el hipotálamo y la sustancia gelatinosa del cordón espinal (Pompeiano, 1992), lo que sugiere su participación en las funciones del hipotálamo, en la regulación de la propiocepción, y en las funciones integrativas de la neocorteza. La localización del mRNA y proteínas que codifican para la expresión de los receptores $5HT_{1A}$ sugieren su expresión a nivel somatodendrítico, más que sobre la terminal axónica; esta localización ha sido confirmada en el núcleo dorsal del rafe por Sotelo (1990), quien demuestra su ubicación sobre el pericarion y las dendritas neuronales, lo cual guarda relación con los estudios electrofisiológicos de Vandermaelen (1986) que demuestran que estos receptores están involucrados en la inhibición del disparo neuronal. La destrucción de los cuerpos celulares de neuronas serotoninérgicas con la neurotoxina 5,7- dihidroxitriptamina o lesiones electrofisiológicas indica la ubicación presináptica del receptor (Vergé, 1986). Sin embargo, en otras áreas cerebrales incluyendo la neocorteza y el hipocampo no se observaron alteraciones de los sitios receptores. La interpretación más conservadora de estos resultados es que la densidad de receptores $5HT_{1A}$ presinápticos probablemente es baja en ciertas regiones cerebrales, lo cual se avala con los efectos lesivos observados en células blanco de áreas como el hipocampo; en esta última la inyección del ácido kainico produce degeneración selectiva de células piramidales e interneuronas con pérdida de los receptores $5HT_{1A}$, lo cual es indicativo de una localización predominantemente postsináptica de los receptores $5HT_{1A}$ en

esa área (Hall, 1985). Sin embargo, Palacios (1989) refiere que la lesión de la fimbria (vía que conecta el septum con el hipocampo), o la destrucción electrofónica del septum produce cambios en los sitios de unión serotoninérgicos_{1A} a nivel del hipocampo. Por otra parte, la disminución de la densidad de los receptores 5HT_{1A} en el hipocampo de pacientes con Alzheimer se relacionó con la pérdida de células piramidales; estas evidencias sugieren que los receptores 5HT_{1A} en el hipocampo presentan localización postsináptica (Cross, 1985).

1.7. Farmacología de los agonistas 5HT_{1A} (8-OH-DPAT, indorrenato y buspirona).

La caracterización farmacológica de los compuestos que inducen respuestas mediadas por la activación de receptores 5HT_{1A} a nivel del sistema nervioso central, está fundamentada en el empleo de una diversidad de modelos experimentales; entre éstos se ha señalado la inducción del síndrome conductual serotoninérgico (Trickleban, 1985). Este síndrome puede ser inducido en ratas por tratamientos que incrementan los niveles sinápticos de 5HT o por algunos fármacos que estimulan directamente a los receptores 5HT_{1A}; además, pueden ser bloqueado por una variedad de antagonistas 5HT₁. En el análisis del síndrome serotoninérgico, Smith (1986) refiere diferentes perfiles dentro del grupo de los agonistas 5HT_{1A}, señalando que el 8-OH-DPAT y 5-Me ODMT inducen todos sus síntomas (posición corporal plana o aplastada, pisadas con apoyo mutuo de los miembros anteriores, movimientos corporales de lado a lado, períodos de temblores musculares, abducción de los miembros posteriores y cola levantada tipo straub), mientras que la buspirona sólo produce la abducción de los miembros posteriores, cola tipo straub y la posición corporal plana; derivando de su estudio que tanto

el 8-OH-DPAT como el 5-Me ODMT pueden ser considerados como agonistas totales. Además, Lucki (1992) comunica que la administración de dosis bajas del 8-OH-DPAT induce el síndrome conductual, mismo que fue antagonizado por los compuestos BMY 7378, NAN 190 y espiperona, así como por los antagonistas β -adrenérgicos como el pindolol o alprenolol. En un ensayo sobre los efectos conductuales del indorrenato, en ratas Wistar, se demostró que dicho compuesto es capaz de inducir los mismos componentes del síndrome serotoninérgico a dosis más altas que las requeridas con el 8-OH-DPAT y 5-Me ODMT (Fernandez-Guasti, 1990), lo que sugiere que el indorrenato también podría ser considerado como un agonista total de los receptores $5HT_{1A}$.

La valoración de las propiedades ansiolíticas y antidepresivas de los fármacos es otro paradigma utilizado para la caracterización de la actividad agonista de algunos fármacos sobre los receptores $5HT_{1A}$. Diversas líneas de investigación han demostrado que algunos agonistas de los receptores $5HT_{1A}$, poseen propiedades ansiolíticas (Broekkamp, 1989). Sin embargo, esos resultados han sido controversiales debido principalmente a variaciones observadas en la acción ansiolítica de esos agonistas, lo cual obedece al modelo de antiansiedad utilizado, las especies de animales ocupadas, la falta de antagonistas selectivos para determinar el o los receptores involucrados en la actividad ansiolítica de los fármacos, entre otras. Con relación al primer punto se ha reportado que el 8-OH-DPAT, indorrenato y buspirona (Hoyer, 1985) Figuras 1, 2, 3 producen respuestas antiansiedad medidas por la evaluación de la conducta de entierro de los animales (Fernandez-Guasti, 1992), conducta exploratoria (Fernandez-Guasti, 1990) y conflicto de Vogel (Eison, 1982). Sin embargo, las disminuciones o falta de

los efectos también han sido señaladas (Pellow, 1987; Critchley, 1987). En cuanto al segundo punto se ha comunicado que la buspirona produce efectos ansiolíticos en pichones de palomas (Wilkin, 1986) y efectos menores en roedores. Por otra parte, mientras que algunos autores no han podido demostrar el bloqueo de las propiedades ansiolíticas de los fármacos con antagonistas 5HT Fernández-Guasti (1990) presenta evidencias que demuestran el antagonismo dado por algunos beta-5HT antagonistas.

Otro parámetro propuesto para estudiar la activación de los receptores $5HT_{1A}$ es la respuesta hipotérmica a la administración de algunos compuestos. Varios agonistas serotoninérgicos $1A$ inducen hipotermia, incluyendo al 8-OH-DPAT, buspirona, gepirona e ipsapirona (Koenig, 1988), esta respuesta puede ser bloqueada por antagonistas $5HT_{1A}$ y hasta el presente existen desacuerdos sobre si la hipotermia inducida por la activación $5HT_{1A}$ esta mediada por receptores pre o postsinápticos (Hillegaart, 1991; O'Connell, 1992).

Las respuestas al 8-OH-DPAT sobre el sistema cardiovascular también han sido comunicadas, señalando que este fármaco disminuye la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca de ratas hipertensas y normotensas; efectos que fueron atribuidos a la estimulación de receptores $5HT_{1A}$ a nivel del sistema nervioso central. Kubo (1995) refiere que la administración sistémica del 8-OH-DPAT puede actuar directamente sobre neuronas simpatoexcitatorias localizadas a nivel de la superficie ventrolateral rostral de la médula (RVLM) causando sus efectos hipotensores en la rata. La microinyección del 8-OH-DPAT y buspirona en la RVLM produjo disminuciones en la presión sanguínea en forma dosis dependiente; efecto antagonizado, en el caso del 8-OH-DPAT, por pindolol y espiperona. Por

su parte la aplicación microiontoforética del 8-OH-DPAT sobre las neuronas simpatoexcitatorias de RVLM inhibió el disparo neuronal; y esta inhibición de la actividad unitaria fue bloqueada por la microiontoforesis de espiperona. Estas evidencias sugieren que el 8-OH-DPAT podría ejercer parte de sus efectos hipotensores a través de la inhibición directa de neuronas simpatoexcitatorias a nivel de la RVLM por la estimulación de receptores $5HT_{1A}$.

Los efectos cardiovasculares del indorrenato también han sido reportados (Hong, 1981), comunicando que dicha sustancia es capaz de disminuir la presión sanguínea arterial, la frecuencia cardíaca y la respuesta a la oclusión de la arteria carótida de manera similar a los efectos descritos para la serotonina. La observación de que con la administración intracerebroventricular de dosis pequeñas del indorrenato se obtuvieron efectos cardiovasculares similares a los obtenidos con dosis más altas administradas por vía oral o parenteral ha sugerido que tales efectos están mediados a través del sistema nervioso central (Hong, 1987).

Aunque la conducta sexual masculina no puede ser considerada como un paradigma para el estudio de nuevos agonistas serotoninérgicos, debido a la complejidad de sus características, Fernandez-Guasti (1990) refiere que varios agonistas $5HT_{1A}$ incluyendo al 8-OH-DPAT, 5 Me ODMT e ipsapirona poseen la particularidad de estimular la conducta copulatoria por reducir el número de intromisiones precedentes a la eyaculación, señalando además que el indorrenato también estimula la conducta sexual masculina de manera similar a otros agonistas $5HT_{1A}$, lo cual podría sugerir que el número de intromisiones precedentes

a la eyaculación está regulado por la estimulación de receptores $5HT_{1A}$.

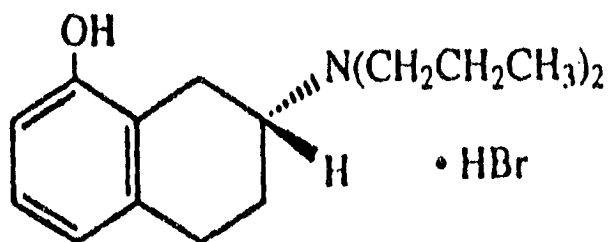


Fig. 1. Estructura del 8-OH-DPAT.

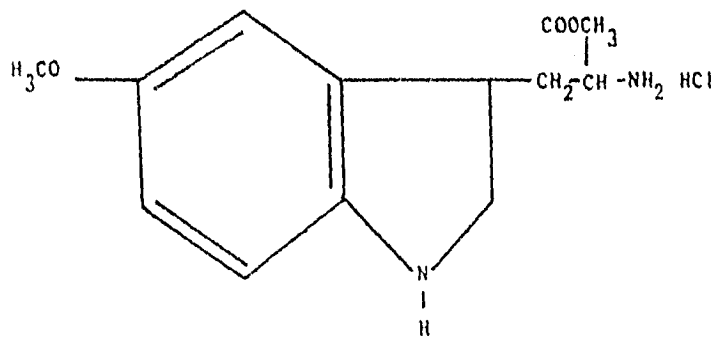


Fig. 2. Estructura del indorrenato.

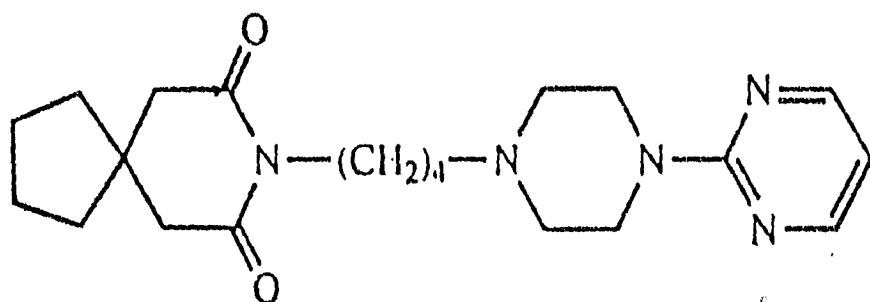


Fig. 3. Estructura de la bupirona.

1.8. *Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos del estudio.*

El análisis de la literatura reveló que el empleo de ratones en el estudio de la fisiopatología y de los mecanismos de tratamiento de la isquemia cerebral ha sido muy limitado, los modelos experimentales documentados a la fecha refieren, en su mayoría, el uso de ratas y gerbil aplicando diversas técnicas para generar la isquemia ya sea en forma focal o global. Sin embargo, la información acumulada demuestra que dentro de los procedimientos utilizados para inducir la isquemia cerebral no se ha explorado las potencialidades del corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes como una alternativa experimental; tampoco se ha contemplado la utilidad del índice acumulado de mortalidad como un parámetro para estimar la letalidad provocada por el proceso isquémico, así como para valorar los mecanismos que de alguna manera incrementan o disminuyen la severidad del mismo. Por otro lado no se ha estudiado el efecto protector del indorrenato, un agonista de los receptores $5HT_{1A}$ de reciente desarrollo, en el tratamiento de la isquemia cerebral. Un efecto de esta naturaleza implicaría su utilidad potencial a nivel clínico. Por todo lo anterior, se plantearon las hipótesis y objetivos de trabajo que dieron lugar a esta tesis.

a. Hipótesis.

La información disponible sobre el tema permite suponer que:

1. La isquemia cerebral producida por el corte secuencial de las arterias carótidas comunes podría ser un modelo potencialmente útil en el estudio de fármacos neuroprotectores.
2. El índice acumulado de mortalidad es un parámetro útil para estimar la letalidad provocada

por la isquemia cerebral y para el estudio de los mecanismos que aceleran o disminuyen el desarrollo del proceso isquémico.

3. Los agonistas serotoninérgicos $5HT_{1A}$ disminuyen las alteraciones conductuales y neurológicas, y el índice acumulado de mortalidad de ratones con corte secuencial de las arterias carótidas comunes.

b. Objetivos.

Los objetivos principales de estas investigaciones fueron:

1. Determinar si el corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes en ratones es un modelo útil para el estudio de fármacos neuroprotectores.

2. Explorar la utilidad del índice acumulado de mortalidad como un parámetro para estimar la letalidad provocada por la isquemia cerebral, así como para valorar los mecanismos que de alguna manera incrementan o disminuyen la severidad del ataque isquémico.

3. Establecer la eficacia de los agonistas $5HT_{1A}$ 8-OH-DPAT, bupiróna e indorrenato para reducir las alteraciones conductuales y neurológicas y el índice acumulado de mortalidad de ratones sometidos a corte secuencial de las carótidas comunes.

II. MATERIALES Y METODOS

1. *Animales*

Se utilizaron ratones machos, adultos, con un peso entre 20-30 g provenientes de la cepa del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (obtenidos originalmente de la cepa Taconic).

Los animales fueron colocados en sus jaulas, dos por caja, mantenidos en condiciones ambientales constantes (temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $55 \pm 3\%$); un ciclo automatizado de luz-oscuridad de 12x12 horas (8 AM a 8 PM) y libre acceso al agua y alimento. En todos los casos se permitió la aclimatación de los ratones a las condiciones ambientales por un período de 1 semana previo a la realización de los experimentos. Los animales se mantuvieron en ayuno por 12 horas antes de cada intervención quirúrgica, con libre acceso al agua.

2. *Ensayos preliminares.*

Como primer grupo de experimentos piloto se realizó la ligadura y corte unilateral de la arteria carótida primitiva. Se empleó un total de 80 ratones, los cuales fueron divididos al azar en 4 grupos de 20 animales cada uno. Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (47 mg/kg ip), colocados en posición supina y se realizó una incisión, bajo microscopía estereoscópica, a nivel del tercio anterior de la línea media cervical ventral a objeto de exponer las arterias carótidas comunes, mismas que fueron separadas cuidadosamente del tronco vago simpático. A continuación se efectuó la ligadura y corte de

la arteria carótida común derecha o izquierda a lotes de 20 ratones respectivamente. Fueron considerados como controles a un grupo de igual número de animales a los que se sometió al mismo procedimiento excepto la ligadura y corte. Una vez terminada la cirugía los animales fueron colocados en unas cajas para la recuperación postanestésica, aproximadamente 1 hora, y posteriormente se procedió a la evaluación de los trastornos conductuales y neurológicos mediante el modelo de Irwin (1964).

En un segundo grupo de ensayos preliminares se realizó la oclusión bilateral temporal de las arterias carótidas comunes a un lote de 10 ratones. Previa exposición de las carótidas comunes, de acuerdo al método descrito, se procedió a realizar el pinzamiento simultáneo de dichos vasos por 4 minutos. Al término de este tiempo, las arterias fueron liberadas verificándose la reperusión sanguínea; finalmente la incisión fue suturada y una hora después se procedió a la evaluación conductual de los animales.

Como tercer grupo de ensayos se efectuó la ligadura y corte unilateral de la arteria carótida primitiva más la oclusión temporal de la arteria carótida contralateral. En un grupo de 20 ratones se realizó la ligadura y corte de la arteria carótida común derecha más el pinzamiento de su homóloga contralateral por 4 minutos. Igual número de ratones fue sometido al proceso inverso, y en ambos casos, se consideró como controles al mismo número de animales sin la ligadura y pinzamiento. Terminada la cirugía los ratones fueron retornados a sus jaulas y una hora postisquemia se procedió a la evaluación de los trastornos conductuales y neurológicos (Irwin, 1964).

El cuarto grupo de ensayos preliminares consistió en realizar la oclusión bilateral

permanente de las arterias carótidas comunes en forma simultánea. A tal efecto, se emplearon 25 ratones, los cuales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (47 mg/kg ip), y bajo microscopía se realizó la ligadura y corte bilateral de las arterias carótidas comunes en forma simultánea. El grupo control recibió el mismo tratamiento excepto la ligadura y corte.

Finalmente, en una quinta serie de experimentos piloto se procedió a realizar el corte bilateral secuencial de las arterias carótidas comunes. Se empleó un lote de 150 animales divididos al azar en 6 grupos de 25 animales cada uno. En un primer grupo de 25 ratones se procedió a realizar la ligadura y corte de la carótida común izquierda. 15 días después se hizo el mismo procedimiento a la carótida contralateral observándose, en cada caso los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas así como el tiempo de muerte. En otras dos series de experimentos, utilizando igual número de animales, se efectuó el corte secuencial de las carótidas comunes incrementando el período entre ambas cirugías, a 24 y 32 días respectivamente. La mortalidad de los ratones fue observada continuamente durante 8 días y los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas se determinaron con el modelo de Irwin (1964).

3. *El corte secuencial de las arterias carótidas comunes.*

Se utilizó un lote de 70 ratones y, en una primera etapa, se procedió a realizar la ligadura y corte de la arteria carótida común izquierda. Treinta y dos días después se hizo la ligadura y corte de la arteria carótida contralateral (tiempo cero). Una vez terminada la segunda cirugía, los animales fueron observados continuamente y en cada caso se evaluaron

los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas (Irwin, 1964), determinándose además el tiempo de muerte. Con el número de muertes ocurridas fue posible calcular el índice acumulado de mortalidad en un período de 24 horas y 8 días. El intervalo de 32 días entre la ligadura y corte de ambas arterias carótidas comunes fue seleccionado para facilitar una máxima funcionalidad del flujo sanguíneo colateral al cerebro así como la posibilidad de una neoformación vascular (Coyle, 1984; Lehman, 1991) que permitan prolongar el tiempo de sobrevivencia de los animales dando así un margen conveniente que permita evaluar el patrón de alteraciones que se generan,

4. Efectos de los agonistas serotoninérgicos $5HT_{1A}$, 8-OH-DPAT, buspirona e indorrenato sobre los trastornos conductuales y neurológicos e índice acumulado de mortalidad de ratones sometidos a corte secuencial de las arterias carótidas comunes.

Se utilizó un total de 384 animales, los cuales fueron divididos al azar en 16 grupos de 24 ratones cada uno. Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (47 mg/kg ip), colocados en posición supina y se realizó, bajo microscopía, una incisión a nivel del tercio anterior de la línea media cervical ventral, en relación a la laringe para exponer la arteria carótida común izquierda, misma que fue cuidadosamente separada del tronco vago-simpático. Excepto en el grupo de animales controles, dicho vaso fue ligado y cortado y finalmente la incisión fue suturada. Los animales fueron colocados en unas cajas para la recuperación postanestésica, aproximadamente 1 hora, con una temperatura de 37°C y posteriormente retornados a sus jaulas. Treinta y dos días después se probaron los efectos

neuroprotectores del 8-OH-DPAT a las dosis de 1, 3.1 y 10 mg/kg; buspirona 3.1, 10 y 31 mg/kg e indorrenato 0.31, 1, 3.1 y 10 mg/kg; inyectados por vía intraperitoneal 30 minutos antes de ser reanestesiados; el grupo control recibió solución salina. La arteria carótida común derecha fue expuesta, y excepto en el grupo control, ligada y cortada (tiempo cero).

La evaluación conductual de los ratones se realizó a las 2, 24 horas y 8 días posteriores a la segunda cirugía (Irwin, 1964), y la letalidad fue observada continuamente por un período de 24 horas y después cada 24 horas durante 8 días. Con el número de muertes ocurridas se calculó el índice acumulado de mortalidad en 24 horas y 8 días.

5. *Fármacos.*

El pentobarbital sódico fue obtenido de Smith Kline Beecham Farmacéutica México, D.F. El 8-OH-DPAT y buspirona fueron adquiridos de Research Biochemical Wayland Ma, USA; y el indorrenato fue gentilmente donado por el Dr. Enrique Hong (Unidad Terapéutica Experimental CINVESTAV-IPN México, D.F.). En todos los casos las diluciones fueron preparadas (solución salina 0.9%) de tal forma que el volumen inyectado fuera siempre 0.1 ml/10 g de peso vivo. Todos los compuestos fueron solubilizados sólo hasta el momento de su utilización.

6. *Análisis estadístico.*

Las diferencias estadísticas entre los grupos controles y los tratados, con los diferentes fármacos, fueron determinadas usando una prueba de X^2 con la corrección de Yates. Los

efectos fueron considerados significativos si el valor de P fue menor o igual a 0.05 (Montgomery, 1991).

III. RESULTADOS

I. Experimentos piloto.

En el Cuadro 1 se muestra el porcentaje de mortalidad en ratones después de la ligadura y corte de las arterias carótidas comunes. Como se observa estos porcentajes fueron iguales para el caso de la carótida primitiva izquierda frente a los controles mientras que para la derecha se obtuvo un incremento del 5%.

A la evaluación conductual entre el 40-50% de los animales, en ambos grupos, presentaron comportamientos similares a los controles, el resto manifestó, en mayor o menor grado, estereotipía y ciertos períodos de excitabilidad dados por disminución en la facilidad de manejo, incremento en la actividad espontánea y exploratoria y/o en el desplazamiento en el plano inclinado y la cuerda tirante. Sin embargo, estos cambios fueron poco consistentes ya que entre las 24 y 48 horas post-cirugía los ratones mostraron conductas semejantes a sus controles.

En las modalidades de oclusión bilateral temporal de las arterias carótidas comunes se observó un alto porcentaje de mortalidad 80-90% frente a los controles tal como se refleja en los Cuadros 2 y 3, de lo que se infiere que la isquemia cerebral bilateral que se genera implica en consecuencia trastornos metabólicos severos incompatibles con la vida. Pese a esto, los animales que sobrevivieron a la evaluación conductual no presentaron trastornos neurológicos aparentes en comparación con sus controles, lo cual evidencia un efecto del todo o nada, los animales, o bien, mueren o son capaces de compensar eficientemente la falla

circulatoria.

Con la técnica de ligadura y corte bilateral de las arterias carótidas comunes realizado de manera simultánea se observó la muerte del 100% de la población a las 24 horas post-cirugía. Algo similar refleja la técnica de ligadura y corte bilateral de las carótidas comunes en forma secuencial con períodos intermedios de 15 y 24 días entre ambas cirugías, donde se destaca que el período de supervivencia del 10% de la población se incrementa a más de 24 horas; lo cual se puso de manifiesto con mayor claridad cuando el período intercirugías se incrementó a 32 días, alcanzando en este caso 35% (Cuadro 4).

CUADRO 1. PORCENTAJES DE MORTALIDAD EN RATONES DESPUES DE LA LIGADURA Y CORTE UNILATERAL DE LA ARTERIA CAROTIDA PRIMITIVA.

	Nº RATONES	% DE MORTALIDAD			TOTAL
		1h	24h	>24h	
CONTROLES	20	5	0	0	5
C.C. DERECHA	20	0	10	0	10
C.C. IZQUIERDA	24	5	0	0	5

CUADRO 2. PORCENTAJES DE MORTALIDAD EN RATONES DESPUES DE LA OCLUSION BILATERAL TEMPORAL DE LAS ARTERIAS CAROTIDAS COMUNES EN FORMA SIMULTANEA.

	Nº RATONES	% DE MORTALIDAD			TOTAL
		1h	24h	>24h	
CONTROLES	10	10	0	0	10
PINZAMIENTO BILATERAL DE LAS CAROTIDAS COMUNES POR 4 MINUTOS	10	90	0	0	90

CUADRO 3. PORCENTAJES DE MORTALIDAD EN RATONES DESPUES DE LA LIGADURA Y CORTE UNILATERAL DE LA ARTERIA CAROTIDA PRIMITIVA MAS LA OCLUSION TEMPORAL DE LA ARTERIA CONTRALATERAL EN FORMA SIMULTANEA.

	N° RATONES	% DE MORTALIDAD			TOTAL
		1h	24h	>24h	
CONTROLES	20	5	0	0	5
C.C. DERECHA/OCLUSION DE LA CONTRALATERAL POR 4 MINUTOS	20	80	10	0	90
C.C. IZQUEIRDA/OCLUSION DE LA CONTRALATERAL POR 4 MINUTOS.	20	70	0	10	80

CUADRO 4. PORCENTAJES DE MORTALIDAD EN RATONES DESPUES DE LA LIGADURA Y CORTE BILATERAL DE LAS ARTERIAS CAROTIDAS COMUNES.

	N° RATONES	% DE MORTALIDAD			TOTAL
		1h	24h	> 24h	
CONTROLES	25	4	0	0	4
SIMULTANEA	25	84	16	0	100
SECUENCIAL CON PERIODO INTERMEDIO DE 15 DIAS	25	70	20	10	100
SECUENCIAL DE 24 DIAS	25	60	30	10	100
SECUENCIAL DE 32 DIAS	25	40	25	35	100

2. *Trastornos conductuales y neurológicos en ratones con corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes.*

Se observó un patrón consistente en cuanto a los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas en todos los animales isquémicos. Posterior a la recuperación de la anestesia, aproximadamente 1 hora, los ratones inicialmente presentaban hiperactividad y estereotipía marcadas, las cuales se incrementaban gradualmente, siendo máximas a las 24 horas postcirugía. Durante este período, en algunos animales, se observó ptosis ipsilateral a la segunda carótida cortada, catatonía, incoordinación motora y en consecuencia falta de respuesta a estímulos nociceptivos (pinzamiento de la cola), desplazamientos en círculo, encorvamiento del dorso, marcha tambaleante, disminución del tono y fuerza muscular, abducción del miembro anterior izquierdo, piloerección, pisadas con apoyo de ambos miembros anteriores, falta de sujeción en la cuerda tirante y deslizamiento en el plano inclinado. En la mayoría de los casos, y a diferentes tiempos los síntomas iniciales fueron seguidos por ataxia, disminución de la actividad locomotora, anorexia, inmovilidad, distrofia y en algunos casos convulsiones; finalmente los animales evolucionaban a la muerte (Figura 4).

Los ratones sobrevivientes permanecían asintomáticos conservando sólo la ptosis, en algunos casos, hasta que fueron sacrificados posterior a los 8 días de observación. Los animales con cirugía sin ligadura y corte (sham operated) no presentaron cambios aparentes en relación al grupo isquémico.

3. *El índice acumulado de mortalidad en ratones sometidos a corte secuencial de las arterias carótidas comunes.*

En la figura 5, se muestran las curvas del índice acumulado de mortalidad de ratones sometidos a corte secuencial de las arterias carótidas comunes en períodos de 60 min, 24 h y 8 días respectivamente.

Como se observa el 17% de los animales muere dentro de los primeros 15 minutos posteriores a la segunda cirugía, ubicándose el índice en 0.17, seguido de 0.29 (29%), 0.38 (38%) y 0.42 (42%) a los 30, 45 y 60 min, respectivamente. A partir de entonces el número de muertes se incrementa progresivamente para ubicarse en 0.63 (63%) a las 24 horas y finalmente en 0.92 (92%) a los 8 días post-cirugía. El índice acumulado de mortalidad del grupo control fue de 0.041 durante todo el ensayo.

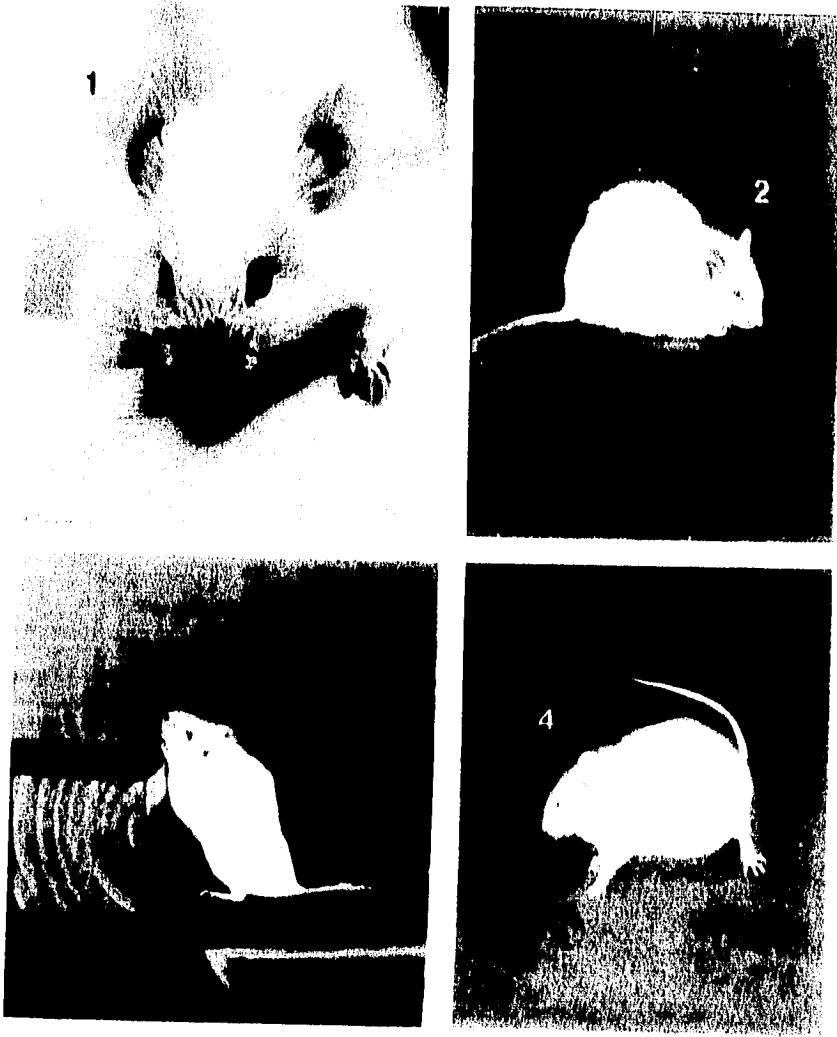


Fig. 4. Efectos de la isquemia bilateral: 1. ptosis de lado derecho, 2. encorvamiento del dorso y piloerección, 3. catatonía, 4. desplazamiento en círculo.

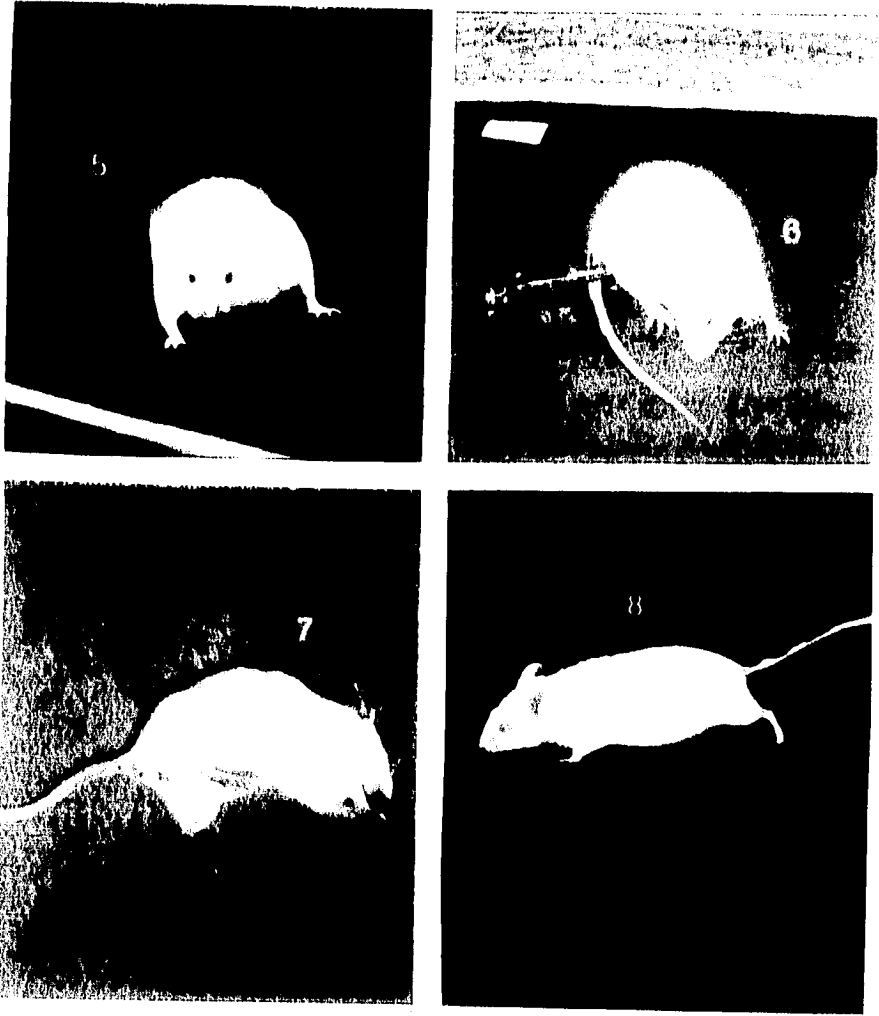


Fig. 4 (Cont.). 5. abducción del miembro anterior izquierdo. 6. incoordinación motora y falta de respuesta a estímulos nociceptivos. 7. convulsiones. 8. control.

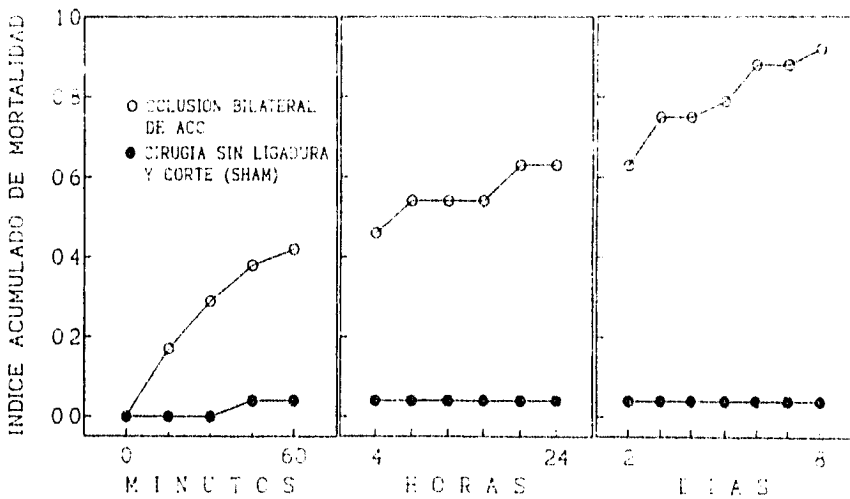


Fig. 5. Índice acumulado de mortalidad de ratones sometidos a corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes. Cada punto representa el curso temporal de la mortalidad de los animales. Las curvas corresponden a grupos de 70 ratones. Se muestran cortes de observación a los 60 min, 24 hrs y 8 días.

4. Efectos de los agonistas 5HT_{1A} sobre los trastornos conductuales y neurológicos e índice acumulado de mortalidad de los ratones.

Los agonistas 5HT_{1A} evaluados en el presente estudio redujeron o retardaron significativamente la incidencia y/o intensidad de las alteraciones conductuales y neurológicas de los ratones y tuvieron efectos diferentes sobre el tiempo de sobrevida de los animales. Por ejemplo la actividad neuroprotectora de la buspirona fue más pronunciada con las dosis extremas (3.1 y 31 mg/kg) siendo ésta más sostenida con la dosis menor, significativa hasta el tercer día de evaluación ($P < 0.05$); por su parte la dosis intermedia (10 mg/kg) no mostró cambios significativos en relación a los controles (Figura 6). A la evaluación conductual los trastornos neurológicos fueron más discretos que los observados en los controles tanto en el número de animales afectados como en la severidad de los síntomas, mismos que estuvieron caracterizados principalmente por la ptosis ipsilateral, disminución de la actividad locomotora, tono y fuerza muscular y desplazamientos en círculo.

Los efectos protectores del 8-OH-DPAT fueron dosis dependientes (Figura 7), observándose una protección evidente con la dosis de 1.0 mg/kg, mientras que con la dosis de 10 mg/kg se obtuvo un 100% de protección durante los primeros 60 minutos postisquemia ($P < 0.01$). La ocurrencia de las alteraciones conductuales y neurológicas de los ratones fue retardada. Los animales se mostraron asintomáticos durante las 12 primeras horas del ensayo, a partir de entonces principalmente la ptosis ipsilateral, disminución de la actividad locomotora, tono y fuerza muscular fue lo más consistente y se presentó en menor grado.

El indorrenato fue activo a la dosis de 1.0 mg/kg y su mayor protección se obtuvo con

la dosis de 3.1 mg/kg (Figura 8). La evaluación de los trastornos conductuales y neurológicos de los ratones demostró un patrón de alteraciones semejante al obtenido con la buspirona. Sin embargo, la dosis de 10 mg/kg no demostró efectos protectores.

En las figuras 6, 7 y 8 también se demuestra que en todos los casos las máximas diferencias entre el índice acumulado de mortalidad de los animales tratados y los controles se observaron dentro de las primeras 24 horas post-cirugía. También es evidente que la protección ofrecida por el 8-OH-DPAT a la dosis de 10 mg/kg persistió hasta el sexto día del ensayo.

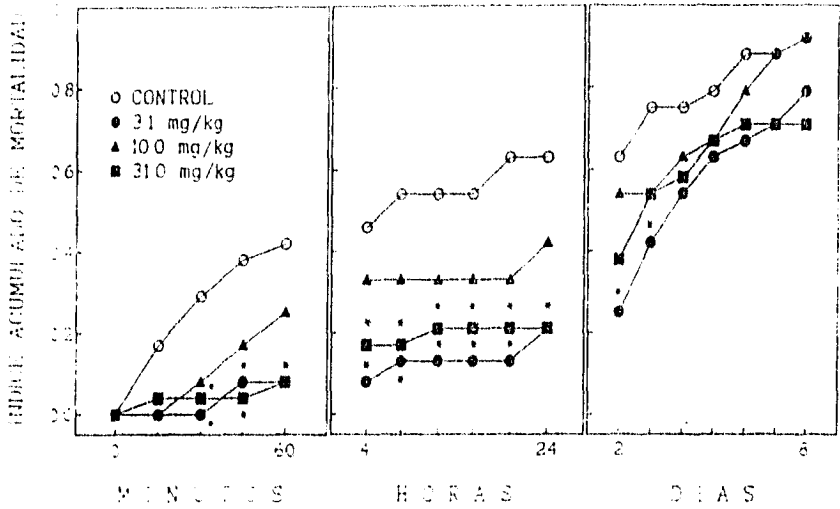


Fig. 6. Efectos de la buspirona, sobre el índice acumulado de mortalidad de ratones con corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes. El fármaco se administró, por vía intraperitoneal, 30 minutos antes del segundo corte (tiempo 0). El grupo control recibió solución salina. Las curvas corresponden a grupos de 24 ratones. Se muestran cortes de observación a los 60 min, 24 hrs y 8 días. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo tratado y el control (prueba de X^2 con la corrección de Yates).

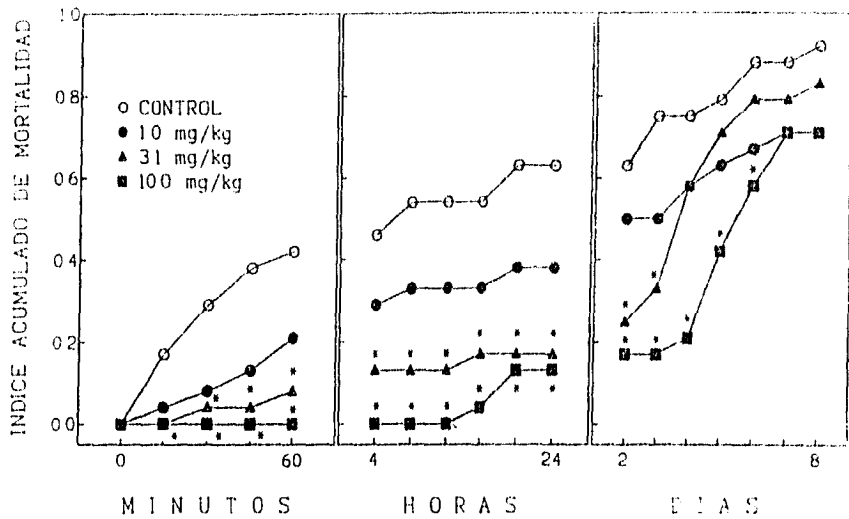


Fig. 7. Efectos del 8-OH-DPAT, sobre el índice acumulado de mortalidad de ratones con corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes. El fármaco se administró, por vía intraperitoneal, 30 minutos antes del segundo corte (tiempo 0). El grupo control recibió solución salina. Las curvas corresponden a grupos de 24 ratones. Se muestran cortes de observación a los 60 min, 24 hrs y 8 días. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo tratado y el control (prueba de X^2 con la corrección de Yates).

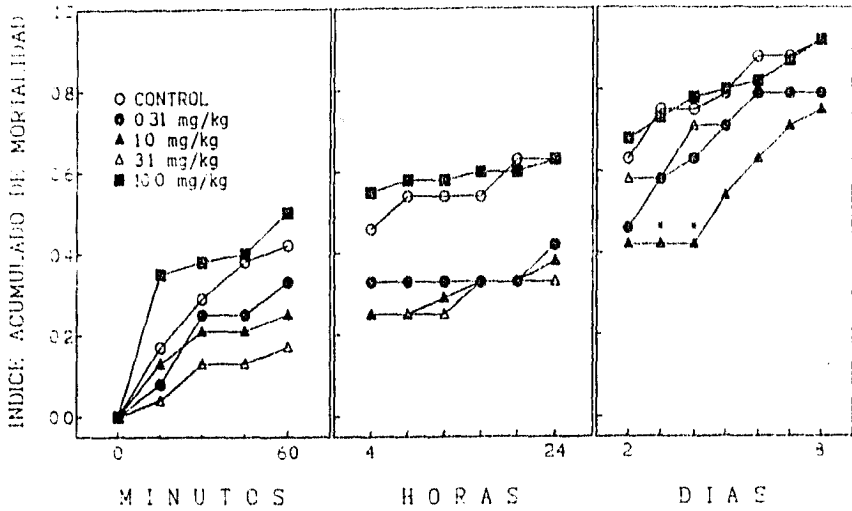


Fig. 8. Efectos del indorrenato, sobre el índice acumulado de mortalidad de ratones con corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes. El fármaco se administró, por vía intraperitoneal, 30 minutos antes del segundo corte (tiempo 0). El grupo control recibió solución salina. Las curvas corresponden a grupos de 24 ratones. Se muestran cortes de observación a los 60 min, 24 hrs y 8 días. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo tratado y el control (prueba de X^2 con la corrección de Yates).

IV. DISCUSION

Como es ya bien conocido, la isquemia global transitoria o permanente conduce a una serie de alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales del tejido cerebral. Estas lesiones han sido atribuidas a un incremento en el flujo intracelular del calcio a través de canales que son activados por voltaje y/o por la unión de algún ligando específico, liberación masiva de neurotransmisores tanto excitatorios como inhibitorios, así como la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno, lo que en su conjunto desencadena una cascada de eventos que conllevan a la muerte neuronal (Buchan, 1990; Hossmann, 1993; Piera, 1995).

La liberación de diversos tipos de neurotransmisores, con la consecuente activación de receptores postsinápticos específicos ha sido particularmente enfatizada como la clave en la inducción de los daños cerebrales. En tal sentido el ácido glutámico y otros aminoácidos de tipo excitatorio han sido relacionados de manera directa con los daños celulares, dadas sus propiedades neurotóxicas ya bien conocidas (Lucas y Newhouse, 1957). Sin embargo estudios de microdialisis también han demostrado incrementos substanciales en las concentraciones extracelulares de otros tipos de neurotransmisores tales como la adenosina, ácido γ -aminobutírico, dopamina, glicina, norepinefrina y serotonina, entre otros (Hagberg, 1987; Globus, 1988, 1989; Damsma, 1990; Sarna, 1990). Entre estos neurotransmisores las monoaminas han sido implicadas en la patogenia del daño neuronal durante los procesos isquémicos, señalándose en particular a la serotonina (Nedergaard, 1987; Rasmussen, 1990). Durante la isquemia la concentración de serotonina se incrementa de 8 a 10 veces dentro del

espacio extracelular hipocampal (Sarna, 1990). El papel fisiológico de la serotonina es muy complejo debido a la existencia de diversos subtipos de receptores (Palacios, 1990) que además presentan diferencias fundamentales en cuanto a la regulación bioquímica de diversas actividades; así por ejemplo los receptores $5HT_2$ se encuentran localizados predominantemente en la corteza cerebral (Hoyer, 1986; Pazos, 1987); mientras que los receptores $5HT_{1A}$ están concentrados en áreas particularmente susceptibles a los procesos isquémicos como son el hipocampo, septum lateral, giro dentado, tálamo, hipotálamo y en la corteza cerebral de la rata (Pazos, 1985).

Sobre estos últimos se ha comunicado que controlan el disparo espontáneo de neuronas del rafe dorsal, y que además pueden mediar la acción inhibitoria de las respuestas serotoninérgicas sobre neuronas corticales e hipocampales (Davies, 1987; Ropert, 1988). Varios autores han señalado que, en preparaciones de rebanadas hipocampales de encéfalos de rata, la serotonina activa una corriente de potasio independiente de calcio vía receptores $5HT_{1A}$ post-sinápticos. La entrada de potasio a la neurona causa su hiperpolarización asociado con una disminución en la resistencia de entrada, permitiendo en consecuencia un incremento en el umbral de disparo y la menor posibilidad de descarga de la célula neuronal. Dado este efecto, la hiperpolarización mediada por $5HT_{1A}$ podría, en cierta forma, compensar la despolarización neuronal observada en los estados de isquemia cerebral y por ende la serie de eventos que se desencadenan. En soporte a esta hipótesis varios estudios han demostrado que los agonistas $5-HT_{1A}$ son capaces de producir una acción hiperpolarizante lenta y prolongada sobre neuronas hipocampales (CA_1), así como la disminución de la amplitud de

sus potenciales post-sinápticos excitatorios y de la frecuencia de disparo neuronal (Beck, 1985; Basse-Tomusk, 1986; Martín, 1987; Rowan, 1987). Por otra parte, durante la última década, varios agonistas $5HT_{1A}$ han sido evaluados por su actividad neuroprotectora en modelos de isquemia cerebral experimental, encontrándose efectos benéficos (Bielenberg, 1990; Bode, Greuel, 1990; Prehn, 1991, 1993; Piera, 1995) de tal modo que dichos mecanismos podrían proveer un nuevo principio terapéutico para el tratamiento de la isquemia cerebral.

En el presente estudio se evaluaron los efectos neuroprotectores de varios niveles de dosis de tres agonistas $5HT_{1A}$, demostrando que la administración intraperitoneal de dosis bajas y moderadas del 8-OH-DPAT, buspirona e indorrenato reducen substancialmente la mortalidad y los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas que se presentan en ratones sometidos a isquemia cerebral severa. En estos experimentos de isquemia global los agonistas $5HT_{1A}$ demostraron varios efectos sobre el número de muertes que ocurren dentro de los ocho días siguientes a la inducción del ataque isquémico. Por ejemplo el 8-OH-DPAT fue efectivo en un rango de dosis de 1 a 10 mg/kg. La máxima reducción en la mortalidad se encontró con la dosis de 10 mg/kg y el efecto protector persistió por varios días posterior a la ligadura y corte de la segunda arteria carótida común.

La reducción en la mortalidad que se observó con la buspirona fue mayor con las dosis de 3.1 y 31 mg/kg que con la dosis intermedia (10 mg/kg) y la máxima protección ocurrió dentro de las primeras 24 horas postisquemia. La reducción en la mortalidad obtenida con el indorrenato tendió a ser dosis dependiente; la actividad protectora fue aparente con las dosis

de 0.31, 1 y 3.1 mg/kg, mientras que la dosis de 10 mg/kg no demostró neuroprotección. Una curva dosis-respuesta en forma de campana similar ha sido reportada para la buspirona en el modelo de isquemia focal en ratones (Bielenberg y Burkhardt 1990) y para el 8-OH-DPAT en ratones con oclusión permanente de la arteria cerebral media (Prenn y cols 1991). Los mecanismos exactos de la acción neuroprotectora de los agonistas $5HT_{1A}$ no son del todo conocidos. Tales efectos no pueden ser restringidos a un incremento en la conductancia al potasio debido a que también se ha comunicado los efectos sobre la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación de la fosfolipasa C (Fargin, 1991; Liu, 1991). Por otra parte, Guido (1988) y Raiteri (1991) encontraron que la liberación excesiva de aminoácidos excitatorios en el cerebelo de la rata durante los procesos isquémicos es reducida por el 8-OH-DPAT. Esta acción farmacológica podría ser extendida al hipocampo el cual contiene una alta densidad de receptores $5HT_{1A}$ (Palacios, 1990). La isquemia cerebral induce una disminución de los niveles de glucosa así como del aporte adecuado de oxígeno, en consecuencia la glucosa es degradada anaeróbicamente hasta ácido láctico, el cual se acumula generando acidosis y posteriormente la muerte neuronal (Siesjö, 1984). Shibata (1992) demostraron, in vitro, los efectos neuroprotectores del 8-OH-DPAT y buspirona sobre las deficiencias, inducidas, en el recambio de 2-desoxiglucosa en rebanadas hipocampales de encéfalos de rata expuestos a hipoxia/hipoglicemia.

Los mecanismos protectores y las propiedades farmacológicas del indorrenato que son responsables de sus efectos sobre el índice acumulado de mortalidad de los ratones no son clarificados con este estudio. Esta sustancia ha demostrado propiedades antihipertensoras

(Hong, 1983; Hong, 1988), así como propiedades ansiolíticas (Fernández-Guasti, 1989) y en altas dosis (31.6 mg/kg) es capaz de inducir alteraciones conductuales en ratas similares a las producidas por agentes serotoninérgicos (Fernández-Guasti, 1990). Esos hallazgos y los resultados de estudios de unión ligando-receptor (Dompert, 1985; Schoeffer, 1988) indican que el indorrenato es un agonista de los receptores $5HT_{1A}$, de tal manera que los efectos protectores reportados en este estudio pueden ser atribuidos a esta acción. La carencia de efectos neuroprotectores observada con la dosis más alta del indorrenato (10 mg/kg) pudo deberse a su interacción con receptores $5HT_2$ (Castillo, 1995). Es importante destacar que para el caso de la buspirona e indorrenato los rangos de dosis que demostraron efectos protectores fueron similares a los que generan los efectos conductuales característicos de la activación de los receptores $5HT_{1A}$ (Middlemiss, 1992), mientras que para el 8-OH-DPAT las dosis requeridas fueron superiores. De estas observaciones se podría especular que los efectos protectores ofrecidos por la buspirona e indorrenato obedecen a la estimulación de receptores $5HT_{1A}$, mientras que la protección obtenida con el 8-OH-DPAT pudo estar mediada por un mecanismo menos específico como por ejemplo la disminución del metabolismo cerebral inducida por hipotermia (Hunter, 1995). En efecto, el mecanismo preciso por el cual el indorrenato redujo el índice acumulado de mortalidad y los trastornos conductuales y neurológicos que se presentan posterior a la inducción de la isquemia cerebral, están aún por determinarse.

Los estudios de la fisiopatología de los accidentes cerebrovasculares han demostrado que la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes en roedores produce isquemia

cerebral de manera consistente (Crockard, 1980) con los daños celulares consecuentes dentro de áreas selectivamente vulnerables del encéfalo, incluyendo a las neuronas de la tercera capa de la corteza cerebral, subcampos hipocampales CA₁ y CA₄ y cara dorsolateral del cuerpo estriado (Hossmann, 1993). La magnitud de los daños estructurales y funcionales son dependientes de la severidad y duración de la isquemia, encontrando que los períodos prolongados tienden a acelerar la evolución de los cambios celulares (Kirino, 1984). Estos hechos podrían permitirnos asumir que un patrón similar de alteraciones tisulares se generan con el corte secuencial de las arterias carótidas comunes. La observación de que los niveles de dosis y la magnitud de protección encontrados con el 8-OH-DPAT y buspirona en nuestros experimentos fueron similares a los reportados por otros investigadores utilizando diferentes modelos experimentales para inducir la isquemia cerebral avalan esta posibilidad. Sin embargo, algunas diferencias básicas podrían ser consideradas, por ejemplo en los modelos de isquemia cerebral transitoria (modelo de oclusión de 2 vasos, isquemia repetitiva por pinzamiento simultáneo de ambas carótidas a diferentes tiempos, etc.), la interrupción del flujo sanguíneo es sólo transitoria y por ende el inicio del estado isquémico así como su reversión son abruptos (Smith, 1984; Shuaib, 1995).

En nuestro modelo existe un período intermedio de 32 días entre la ligadura y corte de ambas carótidas comunes lo cual podría favorecer una máxima funcionalidad del flujo sanguíneo colateral al encéfalo, así como la neoformación vascular (Coyle, 1984; Lehman, 1991). Estas dos nuevas condiciones podrían prolongar el tiempo de sobrevivencia de los animales ofreciendo así un margen conveniente para el estudio de fármacos que de alguna

manera incrementen o disminuyan el índice acumulado de mortalidad de los animales tal como lo demuestran los resultados de este estudio. De tal modo que es posible que los daños tisulares en nuestro modelo no sean completamente similares a los observados con la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes en forma temporal o intermitente. En efecto, las diferentes frecuencias de mortalidades obtenidas con ratones sometidos a corte simultáneo y secuencial de las carótidas comunes favorecen esta hipótesis.

Finalmente, este modelo nos brinda la posibilidad de determinar neuroprotección en términos de índices acumulados de mortalidad una nueva alternativa aún no explotada en esta área.

V. CONCLUSIONES

1. El corte secuencial de las carótidas comunes produce un patrón consistente en cuanto a los trastornos conductuales, alteraciones neurológicas y mortalidad en todos los animales isquémicos.
2. El índice acumulado de mortalidad de los ratones refleja el perfil de la letalidad provocada por la isquemia cerebral.
3. La administración de dosis bajas y moderadas del 8-OH-DPAT, buspirona e indorrenato reducen la mortalidad, los trastornos conductuales y alteraciones neurológicas que se presentan en ratones sometidos a corte secuencial de las arterias carótidas comunes.
4. La máxima protección ofrecida por los agonistas 5-HT_{1A} se observó durante las primeras 24 horas postisquemia.
5. El corte secuencial bilateral de las arterias carótidas comunes es una alternativa como procedimiento para el estudio de fármacos capaces de prevenir o disminuir el daño tisular producto de la isquemia cerebral.

6. El índice acumulado de mortalidad puede ser un parámetro potencialmente útil para estimar la letalidad provocada por la isquemia cerebral.

7. El poder determinar neuroprotección en términos de índices acumulados de mortalidad establece una nueva expectativa aún no explotada en el campo de la neurofisiopatología.

8. Se requiere de estudios adicionales para determinar la naturaleza y magnitud de las alteraciones morfológicas que se inducen con este nuevo modelo, así como de su susceptibilidad a fármacos neuroprotectores que actúan mediante diferentes mecanismos de acción a fin de validar su utilidad práctica en los procesos de investigación de los mecanismos de daño cerebral y estrategias de tratamientos.

ESTA TESIS HA DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. REFERENCIAS

1. Ahlemeyer B, Kriegstein J. Testing drug effects against hypoxic damage of cultured neurons during long-term recovery. *Life Sci* 1989;45:835-842.
2. Akai F, Yanagihara T. Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res* 1993;603:87-75
3. Alps B.J. Drugs acting on calcium channels: potential treatment for ischaemic stroke. *Br J Clin Pharmac* 1992;34:199-206.
4. Araki T, Kanai Y, Murakami F, Kato H, Kogure K. Posts ischemic changes in the binding of excitatory and inhibitory neurotransmitter in the gerbil brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;45:945-949.
5. Barone FC, Clark RK, Feuerstein G, Lenkinskis RE, Sarkar SK. Quantitative comparison of magnetic resonance imaging (MRI) and histologic analyses of focal ischemic damage in the rat. *Brain Res Bull* 1991;26:285-291.
6. Basse-Tomusk A, Rebec GV. Ipsapirone depresses neuronal activity in the dorsal raphe nucleus and the hippocampal formation. *Eur J Pharmacol* 1986;130:141-143.
7. Beck SG, Clarke WP, Goldfarb. Spiperone differentiates multiple 5-hydroxytryptamine responses in rat hippocampal slices in vitro. *Eur J Pharmacol* 1985;116:195-197.
8. Beck T, Nuglish J, Sauer D, Bielenberg GW, Mennel HD, Robbberg C, Kriegstein J. Effects of flunarizine on posts ischemic blood flow energy metabolism and neuronal damage in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1988;158:271-274.
9. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Barthowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986;17(3):472-476.
10. Bielenberg GW, Burkhardt M. 5-hydroxy tryptamine_{1A} Agonist a new therapeutic for stroke treatment. *Stroke* 1990;21(suppl IV):IV-161-IV-163.
11. Bielenberg GW, Beck T. The effects of dizocilpine (MK-801), phencyclidine, after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 1991;552:338-342.
12. Bode-Greuel KM, Klisch J, Horvath E, Glaser T, Traber J. Effects of 5-hydroxytryptamine_{1A} agonist on hippocampal damage after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil. *Stroke* 1990;21(Suppl IV):IV164-IV166.

13. Bondy SC. Intracellular calcium and neurotoxic events. *Neurotoxicol Teratol* 1989;11:527-531.
14. BroekKamp CLE, Berendsen HHG, Jenk F, Van Delft AML. Animal models for anxiety and response to serotonergic drugs. *Psychopathology* 1989;22(suppl 1):2-12.
15. Buchan A, Li H, Pulsinelli WA. The N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801, fails to protect against neuronal damage caused by transient, severe forebrain ischemia in adults rats. *J Neurosci* 1991;11(4):1049-1056.
16. Castillo C, Rosas-Lezama MA, Castillo EF, Larios JF, Hong E. Diferencias entre los efectos del indorrenato y otros agonistas 5-HT_{1A} en la aorta de conejo. *Arch Inst Cardiol Mex* 1995;65:395-402.
17. Chen H, Chopp M, Zhang ZG, Garcia J. The effect of hypothermia on transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12(4):621-628
18. Cochran CHG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991;91(supply 3C):3C-23S-3C-30S.
19. Corbeth D, Evans S, Thomas Ch, Wang D, Jonas RA. MK-801 reduced cerebral ischemic injury by inducing hipotermia. *Brain Res* 1990;514:300-304.
20. Coyle P. Diameter and length changes in cerebral collaterals after middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Anat Rec* 1984;210:357-364.
21. Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 1988;27(2):387-402.
22. Critchley MAE, Handley SL. Effects in the X maze anxiety model of agents acting at the 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacology* 1987;93:502-506.
23. Crockard A, Ianotti F, Hunstock AT, Smith RD, Harris RJ, Symon L. Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* 1980;11:494-498.
24. Cross AJ, Grow TJ, Ferrier IN, Johnson JA, Bloom SR, Corsellis JAN. Serotonin receptors in brain. *Brain Res* 1985;343:403-408.
25. Damsma G, Boisvert DP, Mudrick LA, Wenkstem D, Fibiger HC. Effects of transient forebrain ischemia and pargyline on extracellular concentrations of dopamine, serotonin and their metabolites in the rat striatum as determined by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 1990;54:801-808.

26. Davies MF, Deisz RA, Prince DA, Peroutka SJ. Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on single cortical neurons. *Brain Res* 1987;423:347-352.

27. DeLeo J, Toth L, Schubert P, Rudolphi K, Kreutzberg GW. Ischemia-induced neuronal cell death, calcium accumulation and glial response in the hippocampus of the mongolian gerbil and protection by propentophylline (HWA 285). *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7:745-751.

28. Demerle-Pallardy C, Duverger D, Spirnewyn B, Pirotzky E, Braquet P. Peripheral type benzodiazepine binding sites following transient forebrain ischemia in the rat, effect of neuroprotective drugs. *Brain Res* 1991;565:312-320.

29. Demura N, Mizukawa K, Ogawa N, Yamashita K, Kanazawa I. A cerebral ischemia model produced by injection of microspheres via the external carotid artery in freely moving rats. *Neurosci Res* 1993;17(1):23-30.

30. Desphande JK, Wieloch T. Amelioration of ischemic brain damage following postischemic treatment with flunarizine. *Neurol Res* 1985;7:27-29.

31. Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Effect of the serotonin antagonist Ketanserin on the hemodynamic and morphological consequences of thrombotic infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:812-820.

32. Dompert WV, Glaser T, Traber J. ³H-TVXQ 7821: identification of 5-HT₁ binding sites as a target for a novel putative anxiolytic. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1985;328:467-470.

33. Eison AS, Eison MS, Stanley M, Riblet LA. Serotonergic mechanism in the behavioural effects of buspirone and gepirone. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:701-707.

34. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993;49(3):577-587.

35. Fagg GE. Phencyclidine and related drugs bind to the activated N-Methyl-D-Aspartate receptor-channel complex in rat brain membranes. *Neurosci Lett* 1987;76:221-227.

36. Fargin A, Yamamoto K, Cotecchia S, Goldsmith PK, Spiegel AM, Lapetina EG, Caron MG, Lefkowitz RJ. Dual coupling of the cloned 5-HT_{1A} receptor to both adenylyl cyclase and phospholipase C is mediated via the same G_i protein. *Cell Signal* 1991;3(6):547-557.

37. Fernández-Guasti A, Hong E. Antianxiety effect of various putative 5HT₁ receptor agonists on the conditioned defensive burying paradigm. In: Bevan P, Cools AR, Archer T, eds. *The behavioral pharmacology of 5 HT*. New York. Lawrence Erlbaum Assoc Inc 1989;377-382.

38. Fernández-Guasti A, Escalante A, Hong E, Agmo A. Behavioural actions of the serotonergic anxiolytic indorenate. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;37:83-88.
39. Fernández-Guasti A, Hong E, López-Rubalcava C. Species differences in the mechanism through which the serotonergic agonist indorenate and ipsapirone produce their anxiolytic action. *Psychopharmacology* 1992;107:61-68.
40. Fredholm BB, Lindstrom. The xanthine derivative 1-(5'-oxohexyl)-3-methyl-7-propylxanthine (HWA 285) enhances the action of adenosine. *Acta Pharmacol et Toxicol* 1986;58:187-192.
41. Fredholm BB, Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *TIPS* 1988;9:130-134.
42. Fujikura H, Kato H, Nakano S, Kogure K. A serotonin S₂ antagonist, naftidrofuryl, exhibited a protective effect on ischemic neuronal damage in the gerbil. *Brain Res* 1989;194:387-390.
43. Fujishima M, Ogata J, Sugi T, Omac T. Mortality and cerebral metabolism after bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neurol Neurosurg Psych* 1976;39:212-217
44. Garcia JH. Experimental ischemic stroke: A review. *Stroke* 1984;15:5-14.
45. Gerhardt SC, Boast CA. Motor activity changes following cerebral ischemia in gerbils are correlated with the degree of neuronal degeneration in hippocampus. *Behav Neurosci* 1988;102(2):301-303.
46. Gill R, Woodruff GN. The neuroprotective actions of Kynurenic acid and MK-801 in gerbils are synergistic and not related to hypothermia. *Eur J Pharmacol* 1990;176:143-149.
47. Gill R, Bazell C, Woodruff GN, Kemp JA. The neuroprotective action of dizocilpine (MK-801) in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal ischaemia. *Br J Pharmacol* 1991;103:2030-2036.
48. Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martínez E, Valdés I, Ginsberg MD. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem* 1988;51:1455-1464.
49. Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martínez E, Valdés Y, Ginsberg MD. Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:892-896.

50. Goldberg MP, Pham PC, Choi DW. Dextrorphan and dextromethorphan attenuate hypoxic injury in neuronal culture. *Neurosci Lett* 1987;80:11-15.
51. Goodman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. *Transmision neurohumoral: Los sistemas nerviosos autónomo y motor somático. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Edición octava. México. Editorial Médica Panamericana 1991:97-130.*
52. Green EJ, Dietrich WD, Dijk FV, Busto R, Markgraf GC, Cabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N. Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1992; 580:197-204.
53. Gudelsky GA, Koenig JI, Meltzer HY. Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT) receptor stimulation in the rat. Evidence for opposing roles of 5-HT₂ and 5-HT₁ receptors. *Neuropharmacology* 1986;25(12):1307-1313.
54. Guido M, Roccatagliata E, Ulivi M, Raiteri M. Serotonin-glutamate interaction in rat cerebellum: involvement of 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Eur J Pharmacol* 1988;145:31-38.
55. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 1987;49:227-231.
56. Hagberg H, Andine P, Fredholm BB, Rudolphi K. Effect of the adenosine uptake inhibitor propentopylline on extracellular adenosin and glutamate and evaluation of its neuroprotective efficacy after ischemia in neonatal and adult rats. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia 1990, J Krieglstein wiss Verlagsges Stuttgart.*
57. Hall ED, El Mestikawy S, Emerit MB, Pichat L, Hamon M, Gazlan H. [³H] 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin binding to pre-and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *J Neurochem* 1985;44:1685-1696.
58. Hall DE. Lazaroids: efficacy and anti-oxidant mechanism in experimental cerebral ischemia in: *Pharmacology of Cerebral Ischemia 1990; J Krieglstein and H Oberpichler (Eds) pp 343-350, Wiss Verlagsges, Stuttgart.*
59. Harrison MJ, Brownbill D, Lewis PD, Russell RW. Cerebral edema following carotid artery ligation in the gerbil. *Arch Neurol* 1973;28:389-391.
60. Hillegaart V. Effects of local applications of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on core temperature in the rat. *Psychopharmacology* 1991;103:291-296.
61. Holmes B, Brodgen RN, Heel RG, Speight TN, Avery GS. Flunarizine: a review of its pharmacological and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drug* 1984;27:6-44.

62. Hong E. A serotonergic antihypertensive agent. In: Singer TP, Ondarza R (eds) *Molecular basis of drug action*. Elsevier North-Holland. New York 1981:247-252.
63. Hong E, Rion R, Vidrio H. Stimulation of central serotonin receptors as a novel mechanism of antihypertensive activity. In: Bevan JA, Fujiwara M, Maxwell RA, Mohri K, Shibata S, Toda N, *International Symposium*. New York: Raven Press 1983;273:133-137.
64. Hong E, Rion R, Aceves J, Benitez-King G, Anton-Tay F. Further evidence for a central antihypertensive effect of indorenate. *Proc West Pharmacol Soc* 1987;30:1-3
65. Hong E, Villalon CM. External carotid vasodilatation induced by serotonin and indorenate. *Proc West Pharmacol, Soc.* 1988;31:99-101.
66. Honoré T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, Nielsen FE. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonist. *Science* 1988;241:701-703.
67. Horie R, Mano M, Omura K. Cerebrovascular protection by sequential bilateral carotid artery ligation in aged spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:71-76.
68. Hossmann KA. Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation* 1993;26:225-235.
69. Hoyer D, Engel G, Kalman HO. Molecular pharmacology of 5-HT₁ and 5-HT₂ recognition sites in rat and pig brain membranes: radioligand binding studies with (³H) 5-HT, (³H) 8-OH-DPAT, (-) (¹²⁵I) iodocyanopindolol, (³H) mesulergine and (³H) Ketanserin. *Eur J Pharmacol* 1985;118:13-23.
70. Hoyer D, Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in human brain: II Characterization and autoradiographic localization of 5-HT₁ and 5-HT₂ recognition sites. *Brain Res* 1986;376:97-107.
71. Hunter AJ, Green AR, Cross AJ. Animal models of acute ischemic stroke: Can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *TIPS* 1995;16:123-128.
72. Irwin S, Nodine H, Siegler PE. Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In: *Animal and clinical pharmacological techniques in drug evaluation*. Year Book Med Pubs 1964:36.
73. Iversen SD. 5HT and anxiety. *Neuropharmacology* 1984;23:1553-1560.
74. Kalin K. The natural course of experimental cerebral infraction in the gerbil. *Neurology* 1972;22:510-515.

75. Karler R, Calder LD, and Turkanis SA. Calcium channel blockers and excitatory amino acids. *Brain Res* 1991;551:331-333.
76. Kazda S, Towart R. Nimodipine, a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebral action. *Acta Neurochir* 1982;63:259-265.
77. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropath* 1984;62:201-208.
78. Kiyota Y, Phalmark K, Memezawa H, Smith M, Siesjo B. Free radicals and brain damage due to transient middle cerebral artery occlusion: The effect of dimethylthiourea. *Brain Res* 1993;95:388-396.
79. Koernig JL, Meltzer HY, Gudelsky GA. 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated effects of buspirone, gepirone and ipsapirone. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;29:711-715.
80. Kriegelstein J. Pharmacology of cerebral ischemia. Elsevier Ci. Publ, Amsterdam, New York, Oxford. 1986.
81. Kriegelstein J, Peruche B, Prehn JHM, Welsch M. Protection of neuronal calcium homeostasis by drugs. *Eur J Pharmacol* 1991;205:7-10.
82. Kubo T, Taguchi K, Ozaki S, Amano M, Ishizuka T. 8-OH-DPAT-induced hypotensive action and sympathoexcitatory neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res Bull* 1995;36(4):405-411
83. Lehman M, Owens GK, Kassell NF, Hongo K. Mechanism of enlargement of major cerebral collateral arteries in rabbits. *Stroke* 1991;22:499-504.
84. Levine SD. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Arch Pathol* 1969;87:315-317.
85. Liu YF, Albert PR. Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. *J Biol Chem* 1991;266:23689-23697.
86. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effects of sodium L-glutamate on the inner layer of the retina. *Am Med Assoc Arch Ophthalmol* 1957;58:193-201.
87. Lucki I. 5-HT₁ receptors and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 1992;16:83-93.
88. Mager R, Ferroni S, Schubert P. Adenosine modulates a voltage-dependent chloride conductance in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1990;532(1-2):58-62.

89. Markgraf CG, Green EJ, Watson B, McCabe PM, Schneiderman N, Dietrich D, Ginsberg MD. Recovery of Sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats. *Stroke* 1994;25:153-159.
90. Martin KF, Mason R. Ipsapirone is a partial agonist at 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat hippocampus: electrophysiological evidence. *Eur J Pharmacol* 1987;141:479-483.
91. Martz D, Rayos G, Schielke GP, Betz L. Allopurinol and Dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1989;20:488-494.
92. Mc Crea S, Shuaib A, Wishart T, Ijaz S. Mortality in gerbils with repetitive ischemia: CGSGS-19755/hypothermia therapy. *Neurosci Lett* 1994;170:133-135.
93. McDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P. Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *J Neurophysiol* 1987;58:251-266.
94. Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 1992;31:100-107.
95. NMiddlemiss DN, Tricklebank MR. Centrally active 5HT receptor agonists and antagonists. *Neurosci Biobehav Rev* 1992;16:75-82.
96. Mileson BE, Schwartz RD. The use of locomotor activity as a behavioral screen for neuronal damage following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 1991;128:71-76.
97. Mohamed AA, Gotoh O, Graham DJ, Osborne KA, McCulloch J, Mendelow AD, Teasdale GM, Harper AM. Effect of pretreatment with the calcium antagonists nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 1985;18:705-711
98. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana 1991;167-169.
99. Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich D, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MYT, Busto R. The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: Histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12(3):380-389.
100. Nakayama H, Ginsberg MD, Dietrich WD. (S)-Emopamil a novel calcium channel blocker and serotonin S₂ antagonist, markedly reduces infarct size following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 1988;38:1667-1673.

101. Nedergaard S, Engberg I, Flatman JA. The modulation of excitatory amino acid responses by serotonin in the cat neocortex in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 1987;7:367-379.
102. North RA, Uchimura N. 5-Hydroxytryptamine acts at 5-HT₂ receptors to decrease potassium conductance in rat nucleus accumbens neurons. *J Physiol* 1989;417:1-12.
103. Nuglish J, Karkoutly C, Mennel HD, Roßberg C, Kriegstein J. Protective effects of nimodipine against ischemic neuronal damage in rat hippocampus without changing postischemic cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10:654-659.
104. O'Connell MT, Sarna GS, Curzon G. Evidence for postsynaptic mediation of the hypothermic effect of 5-HT_{1A} receptor activation. *Br J Pharmacol* 1992;106:603-609.
105. Otomo E, Atarashi J, Araki G, Ito E, Onal T, Kuzuya F, Nakada T, Ebi O. Comparison of vinpocetine with ifenprodil-tartrate and dihydroergotoxin mesylate-treatment and results of long-term treatment with vinpocetine. *Curr Ther Res* 1985;37:811-821.
106. Palacios JM, Dieltz MM. Autoradiographic studies of serotonin receptors. In: *The Serotonin Receptors*. E Sanders Bush Ed Clifton NJ: The Humana Press 1989;89-140.
107. Palacios JM, Waeber C, Hoyer D, Mengod G. Distribution of serotonin receptors. *Ann NY Acad Sci* 1990;600:36-52.
108. Palmer Ch, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxi-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res* 1993;33:405-411.
109. Patel J, Zinkand WC, Thompson C, Keith R, Salama A. Role of glycine in the N-Methyl-D-Aspartate mediated neuronal cytotoxicity. *J Neurochem* 1990; 54:849-854.
110. Pazos A, Palacios M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 1985;346:205-230.
111. Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain. III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience* 1987;21:97-122.
112. Pellow S, Johnston AL, File SE. Selective agonists and antagonist for 5-hydroxytryptamine receptor subtypes, and interactions with yohimbine and FG 7142 using the elevated plus-maze in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1987;39:917-928.
113. Piera MJ, Beaughard M, Michelin MT, Massingham R. Effects of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, buspirone and flesinoxan, upon brain damage induced by transient global cerebral ischaemia in gerbils. *Arch Int Pharmacodyn* 1995;329:347-359.

114. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 1992;12:440-453.
115. Prehn JHM, Backhaus BC, Karkoutly C, Nuglich J, Peruche B, Roberg C, Kriegstein J. Neuroprotective properties of 5-HT_{1A} receptor agonist in rodent models of focal and global ischemia. *Eur J Pharmacol* 1991;203:213-222.
116. Prehn JH, Welsch M, Backhaus C, Nuglich J, Aumcier R, Karkoutly Ch, Kriegstein J. Effects of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain Res* 1993;630:10-20.
117. Radja F, Laporte AM, Daval G, Vergé D, Gozlan H, Hanou M. Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central neurons system. *Neurochem Int* 1991;18:1-15.
118. Raiteri M, Guido M, Barzizza A. Activation of presynaptic 5-hydroxytryptamine₁-like receptors on glutamatergic terminals inhibits N-methyl-D-aspartate-induced cyclic GMP production in rat cerebellar slices. *J Pharmacol exp Ther* 1991;257:1184-1188.
119. Rasmussen K, Aghajanian GK. Serotonin excitation of facial motoneurons: Receptor subtype characterization. *Synapse* 1990;5:181-191.
120. Rischke R, Kriegstein J. Protective effect of vinpocetine against brain damage caused by ischemia. *Jap J Pharmacol* 1991;56:349-356.
121. Ropert N. Inhibitory action of serotonin in CA₁ hippocampal neurons in vitro. *Neuroscience* 1988;26:69-81.
122. Rowan MJ, Anwyl R. Neurophysiological effects of buspirone and ipsapirone in the hippocampus: Comparison with 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 1987;132:93-96.
123. Sakamoto N, Kato K, Ohtomo H. Disturbed Ca⁺⁺ homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res* 1986;364:372-376.
124. Sarna GS, Obrenovitch TP, Matsumoto T, Syton L, Cunzon GC. Effect of transient cerebral ischemia and cardiac arrest on brain extracellular dopamine and serotonin as determined by in vivo dialysis in the rat. *J Neurochem* 1990;55:937-940.
125. Schoeffter P, Hoyer D. Centrally acting hypotensive agents with affinity for 5-HT_{1A} binding sites inhibit forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in calf hippocampus. *Br J Pharmacol* 1988;95:975-985.

126. Sheardown MJ, Nielson EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honoré. 2-3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) Quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 1990;247:571-574.
127. Sheldon PW, Aghajanian GK. Serotonin (5-HT) induces IPSPs in pyramidal layer cells of rat piriform cortex: evidence for the involvement of a 5-HT₂-activated interneuron. *Brain Res* 1990;506:62-69.
128. Shibata S, Kagami-Ishi Y, Tominaga K, Kodama K, Ueki S, Watanabe S. Ischemia-induced impairment of 2-deoxyglucose uptake and CA₁ field potentials in rat hippocampal slices: Protection by 5-HT_{1A} receptor agonist and 5HT₂ receptor antagonist. *Europ J Pharmacol* 1992;229:21-29.
129. Shiino A, Harada K, Handa J. Focal brain ischemia model in rats. An experimental study. *Surg Neurol* 1989;31:203-208.
130. Shuaib A, Ijaz S, Kalra J, Code W. Repetitive transient forebrain ischemia in gerbils: delayed neuronal damage in the substantia nigra reticulata. *Brain Res* 1992;574:120-124.
131. Shuaib A, Trulove D, Ijaf S, Kanthan R, Kalra J. The effect of post-ischemic hypothermia following repetitive cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 1995;186:165-168.
132. Siesjö B-K. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 1984;60:883-908.
133. Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjö BK. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984;64:319-332.
134. Smith LM, Peroutka SJ. Differential effects of 5-hydroxytryptamine 1a selective drugs on the 5-HT behavioral syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1513-1519.
135. Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci* 1990;9:461-465.
136. Spedding M, Middlemiss DN. Central effects of calcium antagonists. *TIPS* 1985;179:477-478.
137. Steen PA, Newberg LA, Milde JH, Michenfelder JD. Cerebral blood flow and neurological outcome when nimodipine is given after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984;8:64-78

138. Swan JH, Evans ME, Meldrum BS. Long-term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonoheptanoate in rat model of incomplete forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:64-78.
139. Takahashi K, Akaike N. Calcium antagonist effects on low-threshold t-type calcium current in rat isolated hippocampal CA₁ pyramidal neurons. *J Pharmacol Exptl Therap* 1991;256(1):169-175
140. Tricklebank MD, Forler C, Middlemiss DN, Fozard JR. Subtypes of the 5-HT receptor mediating the behavioural responses to 5-methoxy-N,N-dimethyl tryptamine in the rat. *Eur J Pharmacol* 1985;117:15-24.
141. Vandermaelen CP, Matheson GK, Wilderman RC, Patterson LA. Inhibition of serotonergic dorsal raphe neurons by systemic and iontophoretic administration of buspirone, a non-benzodiazepine anxiolytic drug. *Eur J Pharmacol* 1986;129:123-130.
142. Vergé D, Daval G, Marcin Kiewicz M, Apatey, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7 dihydroxy-tryptamine-treated rats. *J Neurosci* 1986;6:3474-3483.
143. Wang D, Corbett D. Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Res* 1990;533:78-82.
144. Wasserkort R, Hoppe E, Reddington M and Schubert P. Modulation of A₁-adenosine receptor function in rat brain by the polyamine, spermine. *Neurosci Lett* 1991;124:183-186.
145. Welsch M, Nuglish J, Kriegelstein J. Neuroprotective effect of nimodipine is not mediated by increased cerebral blood flow after transient forebrain ischemia in the rat. *Stroke* 1990;21(Suppl IV):IV105-IV 107.
146. White FR, Neuman RS. Pharmacological antagonism of facilitatory but not inhibitory effects of serotonin and norepinephrine on excitability of Spinal motoneurons. *Neuropharmacology* 1983;22:489-494
147. Wieloch T, Gustafson J, Westerberg E. The NMDA-antagonist MK-801 is cerebroprotective in situations where some energy production prevails but not under conditions of complete energy deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9(Suppl 5):S6-S7
148. Wiernsperger N. Serotonin 5-HT₂ receptors and brain circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;16(Suppl):S20-S24.
149. Wilson JD, Braunwald E, Isslbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root PK. Enfermedades cerebrovasculares. *Harrison Principios de Medicina Interna*. Edición

Doceava. México. Interamericana McGraw-Hill 1981:2288-2317.

150. Williams GD, Palmer Ch, Heitjan DF, Smith MB. Allopurinol preserves cerebral energy metabolism during perinatal hypoxia-ischemia: a ³¹P NMR study in unanesthetized immature rats. *Neurosci Lett* 1992;144:103-106.

151. Witkin JM, Barrett JE. Interaction of buspirone and dopaminergic agents on punished behaviour in pigeons. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:751-756.

152. Yoshida S, Ikeda M, Bustos R, Santiso M, Martinez E, Ginsberg M D. Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol and energy metabolism in reversible ischemia origin and fate of free fatty acids. *J Neurochem* 1986;47:744-757.

153. Zhang ZG, Chopp M, Chen H. Duration dependent post-ischemic hypothermia alleviates cortical damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 1993;117(1-2):240-244.