

T

1103

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

122291

291

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE
SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
ATENCIÓN Y SERVICIOS FARMACÉUTICOS

**“EFECTO NEUROPROTECTOR COMBINADO DE AMINOGUANIDINA Y
DAPSONA EN MODELO *IN VITRO* DE INFARTO CEREBRAL Y DIABETES
MELLITUS.”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

QFB. JUVENTINO III COLADO VELÁZQUEZ
MATRÍCULA 207382900

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
ASESOR: DR. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ MUÑOZ
ASESOR: DRA. ADRIANA MIRIAM DOMÍNGUEZ RAMÍREZ

Febrero 2011

1

**“EFECTO NEUROPROTECTOR COMBINADO DE AMINOGUANIDINA Y
DAPSONA EN MODELO *IN VITRO* DE INFARTO CEREBRAL Y DIABETES
MELLITUS.”**

Visto Bueno (Vo.Bo.) del Comité Tutorial:


Tutor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda



Asesor: Dr. Francisco Javier López Muñoz



Asesor: Dra. Adriana Miriam Domínguez Ramírez




Sustentante:

QFB. Juventino III Colado Velázquez (Matrícula 207382900)

**“EFECTO NEUROPROTECTOR COMBINADO DE AMINO GUANIDINA Y
DAPSONA EN MODELO *IN VITRO* DE INFARTO CEREBRAL Y DIABETES
MELLITUS.”**

Jurado del Examen de Grado:

Presidente: Dra. Araceli Díaz Ruiz.  _____

Vocal: Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia.  _____

Secretario: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.  _____

RESUMEN

En el presente trabajo experimental se realizó la evaluación del efecto neuroprotector individual y combinado de los fármacos Aminoguanidina y Dapsona en un modelo *in vitro* de infarto cerebral y diabetes mellitus en rebanadas de *corpus striatum* de ratas Wistar, para determinar su efecto en la producción de óxido nítrico en estas condiciones para evaluar si la combinación de los dos fármacos presentaba un mejor efecto que su administración individual.

Se utilizaron Ratas Wistar machos (180-200 g) que se agruparon en 2 sub-grupos: diabético (n=6) y no diabético (n=6). Para los animales en el grupo diabético se les administró intraperitonealmente estreptozotocina (66 mg/kg), para inducir diabetes no insulino dependiente. A 60 días de haber inducido diabetes, se sacrificaron mediante decapitación. Se realizó disección del cerebro, extrayendo rebanadas de *corpus striatum*, incubándolas en tubos de ensayo conteniendo buffer Krebs-Ringer con burbujeo constante de 95% O₂ y 5% CO₂ en un baño maría a 37°C. Los tejidos fueron sometidos a un proceso de isquemia-reperfusión. Para determinar la producción de óxido nítrico se tomaron alícuotas del buffer, las cuales fueron sometidas a análisis por determinación espectrofotométrica o por cromatografía líquida de alta resolución.

Las muestras fueron sometidas a isquemia-reperfusión, a las que les adicionó aminoguanidina en mostraron una mayor inhibición de la producción de óxido nítrico en comparación con las muestras a las que se les adicionó dapsona. Por su parte las muestras provenientes de animales diabéticos, presentaron niveles basales mucho más altos de óxido nítrico producido, así como una mayor producción al someter a isquemia que en las muestras de animales no diabéticos. Al combinar los dos fármacos, se encontró que el efecto de la dapsona era más pronunciado en tejidos provenientes de animales diabéticos. Dados estos resultados, es necesario probar esta combinación de fármacos en un modelo *in vivo*, para poder determinar mejor la posibilidad de usarla como tratamiento.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Extiendo un agradecimiento al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez por el apoyo brindado para la realización de los procedimientos experimentales necesarios para la realización de este trabajo.

Asimismo extiendo mi agradecimiento a la Coordinación de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

AGRADECIMIENTOS

PERSONALES

A mis padres, a quienes agradezco por todo lo que soy ahora, cuyo apoyo y cariño han sido lo más importante en mi búsqueda del conocimiento y mi desarrollo académico.

A Jesús, pues gracias a su apoyo y compañía he podido finalmente lograr este objetivo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme abierto sus puertas, para estudiar la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y a mis profesores, por compartir sus conocimientos y guiarme a través de esta bella área del saber.

A mi tutor y asesores por su guía y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos: Ana, Carlos, Alberto, Nancy, Christian, Enrique, Luis Eduardo. Por estar siempre apoyándome.

A mis hermanos con quienes siempre puedo contar.

A la Dra. Araceli Díaz y a la Dra. Selva Rivas por haber participado como sinodales externos en el examen de grado.

Juventino III Colado Velázquez

INDICE

1.	Introducción	8
2.	Marco Teórico	11
2.1	Diabetes Mellitus	11
2.2	Enfermedad Vascular Cerebral	17
2.3	Neuroprotección y Precondicionamiento Isquémico	38
2.4	<i>Corpus Striatum</i>	53
2.5	Sintasas de Óxido Nítrico	58
3.	Planteamiento del Problema	66
4.	Hipótesis	67
5.	Objetivos	67
6.	Metodología	68
6.1	Modelo Animal	68
6.2	Modelo Experimental de Isquemia – Reperfusión	68
6.3	Cuantificación de Nitritos Totales Mediante Reacción de Griess Modificada	69
6.4	Cuantificación de L–Citulina por CLAR	70
6.5	Análisis Estadístico	71
7.	Resultados	72
7.1	Evaluación y Elección del Método Analítico	72
7.2	Efecto de la Aminoguanidina	77
7.3	Efecto de la Dapsona	80
7.4	Efecto Combinado de Diferentes Concentraciones de Aminoguanidina y Dapsona	83
8.	Discusión	90
9.	Conclusiones	97
10.	Referencias	98
11.	Anexos	115

1. INTRODUCCIÓN.

El infarto cerebral es un padecimiento que anualmente afecta a 750,000 personas en los Estados Unidos de Norteamérica, de las cuales aproximadamente 150,000 mueren. Los pacientes que sobreviven padecen severos problemas secundarios o secuelas los cuales suponen un costo anual por persona entre 60,000 a 80,000 dólares.

El infarto cerebral puede tener origen hemorrágico o trombótico. En el primero, la ruptura de un vaso sanguíneo ocasiona la liberación de sangre al tejido cerebral, mientras que en el segundo, la oclusión de un vaso sanguíneo por un trombo impide la irrigación sanguínea a una sección del cerebro, dando lugar a un proceso isquémico, que consecuentemente origina severos problemas fisiológicos e incluso la muerte.

El óxido nítrico es una molécula endógena con una variedad de roles fisiológicos en los diferentes tejidos del cuerpo. Se sabe que en el organismo, es sintetizado por enzimas conocidas como Sintetas de Óxido Nítrico cuya función es la de convertir L-Arginina en óxido nítrico (NO) y L-Citrulina. Se han identificado tres isoformas de la sintasa de óxido nítrico: NOS Endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS). Las dos primeras se encuentran expresadas de manera constitutiva en los tejidos y tienen una función fisiológica basal en el organismo, sin embargo, la iNOS únicamente se expresa como respuesta a estímulos inmunológicos o en condiciones como inflamación, daño a tejidos o estrés oxidativo que surge en casos de isquemia-reperfusión. A pesar de conocerse la función del óxido nítrico como sustancia endógena en procesos inmunológicos como factor de la inflamación, existe controversia sobre su papel protector o tóxico en caso de isquemia-reperfusión, ya que existe evidencia contradictoria que muestra que el NO producido durante este proceso es, ya sea protectoro o dañino en algunos tejidos.

Durante un infarto cerebral, el drástico decremento en flujo sanguíneo da lugar a una depleción de nutrientes en el tejido afectado, lo que origina una rápida despolarización de la membrana de las neuronas. Este cambio en la polarización

de membrana causa una activación de los canales de calcio sensibles a voltaje, con lo que se promueve la entrada de calcio al interior de la célula; este incremento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol activa diversos procesos bioquímicos, entre los cuales se tiene la activación de las sintasas de óxido nítrico; dicha activación surge como un mecanismo compensatorio para la drástica alteración de la homeostasis causada por el infarto. Al no haber flujo sanguíneo, la acumulación de óxido nítrico en el tejido activa los procesos de apoptosis dando lugar a muerte celular.

También se sabe que durante procesos isquémicos hay producción de radicales libres tales como iones superóxido, los cuales interactúan con el óxido nítrico formando peroxinitritos que posteriormente causarán daño a los tejidos mediante peroxidación de lípidos dando como consecuencia muerte celular.

Un problema mayor tiene su origen cuando se reestablece el flujo sanguíneo (reperfusión). Durante este proceso, hay un incremento súbito en las concentraciones de oxígeno, el cual llega rápidamente a los tejidos originando una condición conocida como estrés oxidativo, en la cual las células están expuestas a niveles excesivos de oxígeno molecular o sus derivados, llamados Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Es un hecho bien conocido que el estrés oxidativo tiene un papel decisivo en el daño a tejido causado por procesos de isquemia-reperfusión. Se sabe que las ROS activan la transcripción genética de la Sintasa Inducible de Oxido Nítrico (iNOS) mediante la activación del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$. La activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por ROS, también incrementa la expresión de iNOS, que en turno incrementa las concentraciones de NO. Al mismo tiempo, en caso de estrés oxidativo, esta cantidad incrementada de NO interactúa con aniones superóxido, ocasionando un ciclo en el cual se forma más peroxinitrito que consecuentemente aumentará el daño celular liberándose factores de inflamación, daño celular, y una mayor expresión de la iNOS y una mayor producción de óxido nítrico.

La formación de óxido nítrico en sistemas experimentales puede medirse de muchas formas directas e indirectas, tales como cromatografía de gases y de

líquidos, resonancia paramagnética de electrones, espectrometría de masas, espectrofotometría, electroquímica, etc. Sin embargo al utilizar muestras biológicas, la vida media corta del NO y las bajas concentraciones en las que se produce, reducen la utilidad de estos métodos para su análisis en muestras biológicas. Asimismo, muchas de estas técnicas son difíciles de implementar en ciertos laboratorios por los altos costos de equipos y dificultad de interpretar los resultados.

La espectrofotometría y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) constituyen técnicas de mayor utilidad en laboratorios de investigación farmacológica que utilizan muestras de origen biológico debido a su sensibilidad y facilidad de uso.

La importancia de encontrar procedimientos para prevenir y corregir las consecuencias de la producción incrementada de ROS es actualmente uno de los temas más importantes en la investigación de las alteraciones fisiológicas relacionadas al estrés oxidativo durante isquemia-reperfusión. En la clínica no se ha establecido de manera adecuada la eficacia del fármacos que puedan tener un efecto neuroprotector en este proceso con excepción de la Dapsona.

Asimismo en países de la Unión Europea así como en los Estados Unidos de América se ha promovido el uso de la aminoguanidina como suplemento dietético con actividad antioxidante para retrasar efectos de envejecimiento. Se ha encontrado que la aminoguanidina presenta actividad para prevenir la formación de productos de glicosilación avanzada, que se forman debido al proceso de envejecimiento y a padecimientos como Diabetes Mellitus. El uso de la aminoguanidina como agente neuroprotector no ha sido investigado ampliamente, por lo que este trabajo se enfoca en estudiar su actividad inhibidora de la iNOS en cuerpo estriado cerebral, después de haber sometido a un modelo in-vitro de isquemia-reperfusión así como del efecto que presenta en combinación con dapsona, como una novedosa opción terapéutica.

2.1. DIABETES MELLITUS

2.1.1. Reseña histórica

La diabetes mellitus es una enfermedad que fue reconocida desde la antigüedad, los egipcios describieron los síntomas principales de poliuria hacia el año 1550 A.C. en un papiro egipcio. El término diabetes fue usado por vez primera en el siglo segundo de nuestra era como una descripción de condiciones que originan un incremento en la producción de orina. Fue hasta el siglo V en el que dos médicos hindúes (Susruta y Charuka) describieron que la orina de ciertos pacientes era dulce con sabor semejante a la miel y que atraía a las hormigas; asimismo describieron dos formas de diabetes, una que afectaba a pacientes de mayor edad con complexión robusta y otra que afectaba a gente delgada y que no sobrevivían por mucho tiempo (Barnett y col., 2006; Pickup y Williams, 2003).

El término *diabetes mellitus*, una alusión al sabor amielado de la orina, fue primero usado en el siglo XVIII por John Rollo, para distinguir de otros estados poliúricos en que la orina era insípida. El concepto de que la diabetes era una enfermedad sistémica derivada en la sangre fue elaborado un siglo antes (s XVII) por Matthew Dobson, un médico inglés quien publicó una serie de experimentos que mostraron que el suero de un paciente con diabetes así como la orina contenían una sustancia sabor dulce llamada azúcar (Pickup y Williams, 2003).

En el s. XIX, Claude Bernard hizo numerosos descubrimientos en el campo del metabolismo y diabetes, describió el almacenamiento de glucosa en el hígado como un glucógeno; Oskar Minkowski y Josef Von Mering observaron que la pancreatectomía producía diabetes en perros; Langerhans sugirió que los islotes pancreáticos producían una sustancia que disminuía la glucosa, posteriormente esta sustancia fue llamada insulina por Jean Meyer en 1909, aproximadamente una década antes de su descubrimiento (Barnett y col., 2006).

2.1.2. Manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus

Aunque se ha conocido y descrito la diabetes mellitus (DM) a lo largo de los siglos, y se han hecho grandes avances en el entendimiento de sus causas etiológicas, así como de su tratamiento desde el descubrimiento de la insulina; no

se tuvo una definición clara y ampliamente aceptada de este padecimiento sino hasta el principio de la década de 1980. Fue cuando el comité experto en diabetes de la Organización mundial de la salud (OMS) definió al estado diabético como un estado de hiperglucemia crónica que puede resultar de varios factores ambientales y genéticos que a menudo se les encontraba interactuando de manera conjunta (OMS, 2006 y 2008).

La DM se caracteriza por hiperglucemia crónica resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambas, lo que provoca alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Cuando está plenamente expresada, la diabetes se caracteriza por la hiperglucemia en ayunas, pero la enfermedad también puede ser reconocida durante etapas menos evidentes, como por la presencia de intolerancia a la glucosa (Harris, 2004; Ekoé y Zimmet, 2008)

La DM se puede presentar con síntomas característicos como sed, poliuria, polidipsia, visión borrosa, pérdida de peso e infecciones. En sus casos más severos pueden desarrollarse estados de cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetónico y conducir a estupor, coma y muerte.

Las complicaciones a largo plazo de la DM incluyen el desarrollo progresivo de enfermedad de los capilares de los riñones y retina, daño de los nervios periféricos y excesiva aterosclerosis. Las manifestaciones clínicas de éstas complicaciones, por lo tanto, incluyen nefropatía que puede conducir a falla renal, retinopatía con ceguera potencial, neuropatía con riesgo de úlceras en los pies y posterior amputación, articulaciones de Charcot, y características de disfunción autonómica, incluyendo disfunción sexual. La gente con diabetes está en un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, vascular periférica y cerebrovascular (Harris, 2004; Ekoé y Zimmet, 2008).

2.1.3 Clases de diabetes mellitus.

- **Diabetes mellitus tipo 1.**

Esta clase de diabetes abarca los casos en los que se encuentra la destrucción mediada por procesos autoinmunes de las células β del páncreas, lo que puede conducir a un estado en el que es absolutamente necesaria la administración de insulina a fin de prevenir el desarrollo de cetoacidosis, coma y muerte. En este tipo de diabetes encontramos como características la presencia de anticuerpos contra ácido glutámico descarboxilasa (GAD), células del islote pancreático, insulina o la proteína parecida a tirosina fosfatasa (ICA 512), como indicadores del proceso autoinmune asociado por la destrucción de las células β ; en algunos casos no hay evidencia de anticuerpos presentes entonces se clasifican como "tipo 1 idiopática". Aquellas formas de destrucción o falla de las células β cuyas causas pueden ser reconocidas, no son incluidas en éste tipo de diabetes (p.ej. fibrosis quística y defectos mitocondriales) (Harris, 2004; Ekoé y Zimmet, 2008). La velocidad de destrucción de las células β es muy variable, puede ser rápida en niños, pero está bien descrita una forma de progreso lento previamente conocida como "diabetes autoinmune latente en adultos" (LADA por sus siglas en inglés). Los picos de incidencia de este tipo etiológico de diabetes se presentan en niños y adolescentes, pero puede ocurrir a cualquier edad. Los pacientes son raramente obesos, sin embargo, la presencia de obesidad no es incompatible con el diagnóstico (Bennet y col., 2006; Rodríguez, 2002; Gómez y col., 2004).

- **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)**

Ésta es la forma más común de diabetes y se caracteriza principalmente porque se presenta resistencia a la insulina y secreción disminuida de insulina, pudiendo ser predominante cualquiera de las dos. Al manifestarse clínicamente la enfermedad usualmente se presentan ámbas características. La gente con DM2 es frecuentemente resistente a la acción de la insulina, y a menudo en su vida no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Este tipo de diabetes permanece sin diagnosticarse a menudo por muchos años, debido a que la

hiperglicemia no es tan severa como para provocar síntomas notables; sin embargo, estos pacientes presentan un incrementado riesgo de desarrollar complicaciones micro y macro vasculares (Bennet y col., 2006; Rodríguez, 2002; Gómez y col., 2004). Las razones específicas del desarrollo de este tipo de diabetes no son aun conocidas, pero se sospecha que los componentes genéticos están fuertemente involucrados. La destrucción autoinmune del páncreas no ocurre, y los pacientes no tienen ninguna otra causa conocida de diabetes (Harris, 2004; Rodríguez, 2002). El riesgo de desarrollar DM2 incrementa con la edad, obesidad y pérdida de actividad física. Ocurre más frecuentemente en personas con hipertensión o dislipidemia y su frecuencia varía en los diferentes subgrupos étnicos. La DM2 es a menudo asociada con predisposición familiar- genética. La genética de la DM2 es muy compleja y no está claramente definida.

2.1.4 Diabetes mellitus en México

- **Prevalencia**

Los estimados para el 2007 publicados por la FID12 colocan a México en el décimo lugar a nivel mundial, con una prevalencia cercana al 11 % y con tendencia a incrementarse a cerca del 13 % para el 2025.

Los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006, arrojaron una prevalencia de diabetes (por diagnóstico médico previo) en los adultos (>20 años de edad) a nivel nacional de 7%, y fue mayor en las mujeres (7.3%) que en los hombres (6.5%). En el estrato de 50 a 59 años, dicha proporción llegó a 13.5%, 14.2% en mujeres y 12.7% en hombres. En el estrato de 60 a 69 años, la prevalencia fue de 19.2%, 21.3% en mujeres y 16.8% en hombres (Olaiz y col., 2006).

- **Mortalidad**

En el 2007, el Sistema Nacional de Información en Salud reportó a la diabetes como la principal causa de muerte tanto en hombres como en mujeres. Por otra parte, las complicaciones más frecuentes de la diabetes, las enfermedades isquémicas del corazón, figuran en segundo lugar en ambos sexos

(SINAIS, 2007). Es de hacer notar que en hombres la quinta causa de muerte es enfermedad cerebrovascular así como también es la tercera causa de muerte en mujeres (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en varones en México (2007)
(Fuente: SINAIS–SSA 2007)

Causa	Muertes	Tasa
Diabetes Mellitus	33,310	64.0
Enfermedades isquémicas del corazón	31,478	60.5
Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	20,941	40.2
Enfermedad cerebrovascular	13,912	26.7
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	11,132	21.4
Accidentes de tránsito	8,190	15.7
Infecciones respiratorias agudas bajas	7,815	15.0
Agresiones (homicidios)	7,777	14.9
Nefritis y Nefrosis	6,362	12.2
Enfermedades hipertensivas	6,226	12.0
Causas mal definidas	5,430	10.4
Otras	132,337	254.2
TOTAL	284,910	547.2

* Tasa por cada 100,000 hombres.

Tabla 2. Principales causas de mortalidad en mujeres en México (2007)
(Fuente: SINAIS–SSA 2007)

Causa	Muertes	Tasa
Diabetes Mellitus	37,202	69.2
Enfermedades isquémicas del corazón	24,543	45.7
Enfermedad cerebrovascular	15,362	28.6
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	8,592	16.0
Enfermedades hipertensivas	8,372	15.6
Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	6,905	12.9
Infecciones respiratorias agudas bajas	6,760	12.6
Nefritis y Nefrosis	5,372	10.0
Tumor maligno de la mama	4,609	8.6
Desnutrición calórico protéica	4,533	8.4
Tumor maligno del cuello del útero	4,046	7.5
Causas mal definidas	5,129	9.5
Otras	97,911	182.2
TOTAL	229,336	426.8

* Tasa por cada 100,000 mujeres.

- **Carga de la enfermedad en México**

En México, la diabetes es la causa más frecuente de incapacidad prematura, ceguera y falla renal, además de una de las principales causas de morbilidad. Una publicación sobre la estimación del gasto por diabetes del Sistema de Salud mexicano (gasto público) en el 2005, estimó el costo total de la enfermedad de 317 millones de dólares (MDD) por año. Los costos directos significaron en aquel año 140 MDD (12% por atención médica de rutina, 39% por terapia farmacológica, 12% por hospitalización, y 32% por tratamiento de complicaciones), los gastos debidos al manejo de complicaciones crónicas fueron de 45 MDD (73% por nefropatía, 11% por retinopatía, 10% por enfermedad cardiovascular, 3.6 % por neuropatía, y 2.4 % por enfermedad vascular periférica). Los gastos indirectos significaron 177 MDD sin tomar en cuenta gastos por mortalidad y discapacidad (Arredondo y Zúñiga, 2004).

Una publicación reciente analizó los gastos debidos al tratamiento de la diabetes en el ámbito privado a través de costos “del bolsillo” y costos pagados a través de seguros médicos privados en el 2005. Se dedujo que del total de gasto en México en ese año (317 MDD), 52% correspondió a gastos “del bolsillo”, 3% a gastos pagados por seguros privados, y 45% a gasto público (Arredondo y Barceló, 2007).

Publicaciones recientes han sido propuesto acciones a tomar en el Sistema de Salud mexicano con fines de reducir la incidencia y prevalencia de diabetes y sus consecuencias en los próximos años (Arredondo y Barceló, 2007; Córdoba-Villalobos y col., 2008).

2.2 ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL.

La circulación sanguínea al Sistema Nervioso Central (SNC) o flujo sanguíneo cerebral (FSC), normalmente es de unos 50 a 55 ml por minuto por 100 g de tejido, es un sistema autorregulado (Daube y col., 1986) que debe proveer el adecuado y constante aporte de oxígeno, glucosa y otros nutrientes (Robbins y col., 2000; Chaves, 2000; Sharp y col., 2004). Así mismo, debe favorecer la remoción de dióxido de carbono, ácido láctico y otros productos metabólicos de desecho (Kandel y col., 1991). Es interesante mencionar que el cerebro compromete aproximadamente el 2% de la masa corporal total del humano y sin embargo, es capaz de consumir aproximadamente 20% del total de oxígeno contenido en la sangre circulante (Kandel y col., 1991; Weinberger, 2000); lo que indica que las células del encéfalo son dependientes en gran manera del oxígeno que obtienen a partir de la sangre (Juurlink y Sweeney, 1997) y por tanto demuestran su alta actividad metabólica con la cual se mantiene el correcto funcionamiento de procesos mentales como percepción, aprendizaje y memoria (Muñoz, 2001; Sharp y col., 2004).

2.2.1 Definición

El concepto de Enfermedad Vasculare Cerebral (EVC) se refiere a cualquier alteración cerebral secundaria a algún proceso patológico de uno o más vasos sanguíneos ocasionando la caída del flujo sanguíneo por debajo de un nivel crítico y puede afectar los sentidos, el habla, el procesamiento de ideas, la memoria, causar parálisis, coma y/o la muerte (Mokhtar, 1990; Weinberger, 2000; Díez-Tejedor, 2001). Son sinónimas las denominaciones Accidente Vasculare Cerebral (AVC); el término latino "ictus", que al igual que su correspondiente anglosajona "stroke" significa "golpe", y describen perfectamente el carácter brusco y súbito del proceso (Díez-Tejedor, 2001).

2.2.2 Clasificación

En 1990 fue propuesta la "III Clasificación de Enfermedades Cerebrovasculares, por el National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS, 1990) con la finalidad de definir de forma precisa

los tipos de accidentes vasculares cerebrales, así como los diversos aspectos etiológicos (Figura 1), patogénicos y diagnósticos. Según su presentación clínica, la enfermedad vascular cerebral puede ser “asintomática” o “sintomática”. Según su naturaleza, se puede presentar como hemorragia o como isquemia, en una proporción del 16% para la primera y el 84% para la segunda (Díez-Tejedor, 2001). La diferencia entre una y otra es la presencia o ausencia de sangre, respectivamente.

Independientemente del origen, los AVC pueden ocurrir a cualquier edad y por diversas causas que incluyen enfermedades cardíacas, traumas, infecciones, deformaciones vasculares, desórdenes inmunológicos y toxinas exógenas (Kandel y col., 1991; Weinberger, 2000).

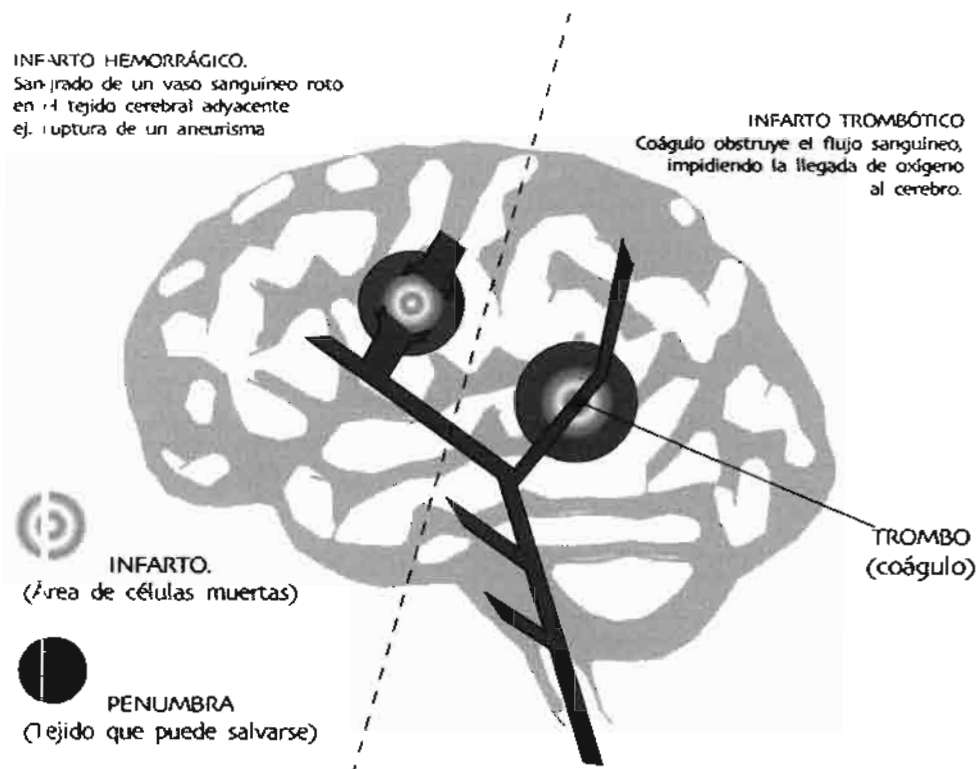


Figura 1. Ilustración representativa de la clasificación de los Accidentes Vasculares Cerebrales según su etiología.

- **Infarto hemorrágico.**

En el infarto hemorrágico lo que se produce es la ruptura de un vaso sanguíneo. La hemorragia puede ser dentro de los hemisferios cerebrales, tallo

cerebral o cerebelo denominándose "intraparenquimal" o bien en el espacio subaracnoideo sobre la superficie cerebral denominándose "subaracnoidea". La intraparenquimal se presenta en un 10% del total de las hemorragias cerebrales en tanto que la subaracnoidea sólo representa el 6%. La causa más frecuente de rotura de un vaso sanguíneo cerebral es la presencia de un aneurisma (dilatación permanente de una arteria ocasionada por la debilidad de su pared) (Robbins y col., 2000; Sweeney y col., 1995).

- **Infarto Oclusivo.**

La disminución o interrupción del flujo sanguíneo a una área del cerebro puede deberse a una reducción de la presión de perfusión o ser secundaria a una obstrucción de vasos de pequeño o gran calibre. En base a la localización anatómica y al tamaño preciso de la lesión a que da lugar, la isquemia que involucra al cerebro completo y ocurre durante un ataque cardíaco o hipotensión sistémica severa se denomina "isquemia cerebral global", y aquella que afecta regiones restringidas del cerebro y ocurre en una amplia variedad de cuadros clínicos, pero más comúnmente resultado de arteriosclerosis vascular cerebral se denomina "isquemia cerebral focal" (Iadecola, 1999).

El mecanismo de producción de la obstrucción o disminución en el flujo sanguíneo al cerebro puede deberse a:

- **Arteriosclerosis:** Patología que consiste en la acumulación progresiva de calcio, colesterol y otras grasas en la pared de las arterias (placas de ateroma), lo que hace que se vuelvan rígidas. En ciertas zonas de las arterias el estrechamiento puntual es más intenso, llegando a tapar casi por completo el paso de sangre al cerebro.
- **Trombosis cerebral:** Una zona obstruida por placas de ateroma que sirven como iniciador para la formación de una agregación plaquetaria, formando coágulos o trombos que impiden la circulación sanguínea en esa área. La trombosis ocupa el mayor porcentaje (53%) de las isquemias cerebrales.
- **Embolia cerebral:** Uno o unos de estos trombos se pueden liberar llegando a arterias más pequeñas por las que no pueden pasar, las taponan totalmente

impidiendo el flujo de sangre. Esta situación es muy grave ya que puede evolucionar a la muerte de las células cerebrales implicadas y por ende la pérdida irreversible de las mismas (Figura 2) (Robbins y col., 2000; Sweeney y col., 1995).

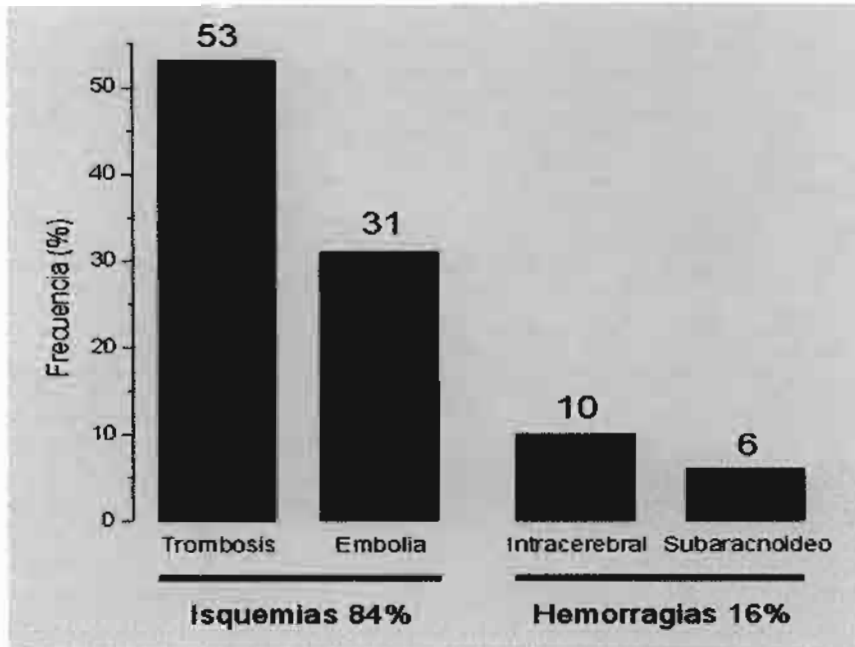


Figura 2. Gráfico de frecuencia en porcentaje de los Accidentes Vasculares Cerebrales.

El tiempo de instalación de los síndromes isquémicos cerebrales es breve (minutos u horas). Así, si la duración es no mayor de 24 horas, se recupera sólo y no hay secuelas, se habla de "isquemia cerebral transitoria o ataque isquémico transitorio (TIA)" en tanto, si los síntomas persisten, se considera como "isquemia cerebral permanente o infarto isquémico cerebral (CII)" (Corvera-Bernardelli y col., 1999). El infarto cerebral permanece como una de las causas principales de muerte e invalidez a través del mundo. Más del 80% de los infartos son resultado de la isquemia cerebral (Iadecola, 1999). Aproximadamente el 10% de los infartos isquémicos es precedido por un TIA, y el 40% de los pacientes que experimentan un TIA presentan un infarto posterior. El infarto puede desarrollarse en vasos sanguíneos pequeños profundos del cerebro llamado infarto de pequeños vasos o bien; en vasos principales en la superficie del cerebro, llamado infarto de grandes vasos.

Desde el punto de vista anatomopatológico, podemos encontrar dos tipos de infarto cerebral:

- Infarto cerebral pálido. Generado en la zona distal a una oclusión arterial persistente. En las zonas con flujo sanguíneo, como por ejemplo el borde del infarto, se observa presencia leucocitaria. Posteriormente los macrófagos ocupan la zona y los productos necróticos se eliminan durante meses.
- Infarto cerebral hemorrágico. Presenta una importante concentración de eritrocitos dentro de la zona infartada. Las placas petequiales predominan en la sustancia gris, dada su mayor vascularización relativa. Frecuentemente está asociado a infarto de mecanismo embólico (Diéz-Tejedor, 2001).

2.2.3 Manifestaciones clínicas.

Si el cerebro es privado de sangre y oxígeno durante dos horas o más, las células cerebrales mueren y no pueden ser sustituidas. Así las partes del cuerpo que son controladas por el área afectada del cerebro presentan disfunciones. Esta pérdida de la función, puede ser temporal o permanente según la severidad del evento isquémico. Los síntomas de una isquemia cerebral dependen del lugar en el que se produzca la disminución del flujo sanguíneo, así como de la intensidad y extensión de la isquemia. Conviene recordar que el aporte de sangre al cerebro se consigue mediante las dos arterias carótidas y las dos arterias vertebrales que se unen formando el tronco basilar; mismos que en la base del cráneo establecen una comunicación formando el polígono de Willis.

Los principales síntomas que acontecen son:

- Cefalea intensa y repentina de origen desconocido.
- Entumecimiento u hormigueo en el brazo, la pierna o el rostro, generalmente de un lado del cuerpo.
- Debilidad o parálisis del brazo, la pierna o el rostro, generalmente de un lado del cuerpo.
- Incapacidad para caminar y/o ataxia.
- Vista nublada o amaurosis en uno o ambos ojos.

- Tinnitus y/o hipoacusia.
- Disgrafía, dislexia y/o afasia.
- Mareo, confusión, desmayo o coma.

2.2.4 Diagnóstico.

En la mayoría de los casos, los médicos detectan la enfermedad mediante una exploración de rutina, a partir de la historia clínica y de los síntomas que presenta el sujeto. Ocasionalmente, la obstrucción de la arteria carótida produce un soplo que se puede escuchar colocando un estetoscopio en el cuello encima de la misma; sin embargo, no siempre se escuchan soplos. Otros métodos de diagnóstico utilizados son:

- Ultrasonografía Doppler: Ecografía que utiliza ondas sonoras para examinar el flujo sanguíneo y medir el grosor de las arterias carótidas.
- Angiografía por resonancia magnética: Resonancia magnética que emplea campos magnéticos inofensivos pero potentes para producir una imagen detallada de las arterias del cerebro.
- Oculoplefetismografía: Mide los pulsos de las arterias que se encuentran en el fondo del ojo. Es una manera indirecta de detectar obstrucciones en las arterias carótidas.
- Arteriografía y angiografía por sustracción digital: Métodos radiográficos que permiten visualizar las arterias carótidas después de inyectar un medio de contraste especial radio-opaco en el torrente sanguíneo.

2.2.5 Tratamiento.

El tratamiento de la isquemia cerebral requiere el tratar la arterosclerosis u otros trastornos subyacentes, siendo necesario muchas veces cambios en el estilo de vida. Además, pueden ser necesarios tratamientos farmacológicos, cateterismos e intervenciones quirúrgicas para contrarrestar los efectos de la enfermedad de las arterias carótidas y reducir el riesgo de sufrir un AVC (The Merck Manual, 2005). Dentro de los tratamientos farmacológicos se han estudiado tres agentes tromboembólicos (activador de plasminógeno, uroquinasa y estreptoquinasa) pero el principal problema es la posibilidad de convertir un infarto

isquémico en hemorrágico (Sweeney y col., 1995). Otro tratamiento farmacológico que se ha estudiado recientemente es el efecto neuroprotector que proporciona la dapsona y que se describe a continuación.

- **Dapsona.**

La 4-[(4-aminobenceno)sulfonil]anilina o Dapsona, es un fármaco utilizado en combinación con rifampicina y colfazimina como tratamiento para la Lepra, así como tratamiento de segunda línea para profilaxis contra infecciones causadas por *Pneumocystis carinii* en pacientes VIH seropositivos, así como tratamiento para el acné severo en el que la isotretinoína y la prednisona no han tenido efecto.

La dapsona tiene efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores ya que bloquea la enzima mieloperoxidasa que convierte peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en ácido hipocloroso (HClO) como parte del mecanismo antimicrobiano realizado por los neutrófilos para matar bacterias (Weiss, 1989). Es precisamente el ácido hipocloroso el oxidante más tóxico y potente generado por los neutrófilos, y potencialmente puede causar daño tisular significativo en muchos padecimientos inflamatorios. Cuando hay ausencia de iones cloruro o cuando hay exceso de peróxido de hidrógeno, la mieloperoxidasa se convierte a su forma inactiva (Bozeman, 1990). La dapsona inhibe reversiblemente la actividad de esta enzima al promover la formación de un intermediario inactivo de la enzima y por consiguiente previniendo la conversión del H_2O_2 en HClO (Bozeman, 1992).

También se ha sugerido que este mecanismo es la razón del efecto neuroprotector observado en enfermedades inflamatorias como enfermedad de Alzheimer e infarto cerebral (Díaz-Ruiz y col., 2008).

A este respecto se realizó un estudio experimental del efecto neuroprotector de la dapsona en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas (Rios y col., 2004), encontrándose evidencia de que en efecto, la dapsona proporcionaba un efecto neuroprotector tras someter a isquemia por oclusión durante 15 minutos, como puede observarse en la Figura 3.

Posteriormente, un estudio doble ciego controlado con placebo realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México en el período de Enero de 1999 a Enero de 2000, en el que se les administró una dosis única de 200 mg de dapsona o placebo a un grupo de 30 pacientes con infarto en la zona de la arteria media cerebral; encontró que los pacientes a los que se les administró dapsona mejoraron significativamente encontrándose que es un fármaco eficaz y seguro para el tratamiento de infarto cerebral en humanos (Nader-Kawachi, 2007).



Figura 3. Corte coronal del cerebro de una rata (izquierda) control, (derecha) tratada con dapsona, 15 min después de la oclusión permanente de la arteria cerebral media, como modelo de infarto cerebral. Tinción Hematoxilina-eosina (Rios y col., 2004).

2.2.6 Eventos vasculares y celulares durante la isquemia.

Uno de los principales logros de la neurología vascular moderna es la descripción y el entendimiento de los cambios vasculares, celulares, eléctricos y bioquímicos que constituyen la cascada isquémica y que suceden después de la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC).

El metabolismo y la viabilidad del tejido cerebral dependen principalmente del aporte de oxígeno y nutrientes a través de la rica circulación cerebral, con su intrincada red de ramas colaterales que suplen la irrigación en caso de necesidad y de estrictas medidas de autorregulación (Daube y col., 1986). Para comprender la evolución y consecuentemente el evento isquémico se debe considerar el FSC (Sharp y col., 2004). Un flujo sanguíneo normal de 50 a 55 ml/min/100 g de tejido garantiza la actividad eléctrica de las neuronas y la preservación de sus funciones biosintéticas. Después de la aparición de una isquemia cerebral es posible

observar dos regiones morfológicas de importancia fisiológica para el desarrollo del daño debido a que la reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el territorio isquémico (Lee y col., 1999; Lipton, 1999; Sweeney, 1997). Ambas zonas serán determinadas por la extensión del tejido cerebral que sufre de la carencia de sangre secundaria a la oclusión del vaso sanguíneo durante la isquemia (Figura 4).

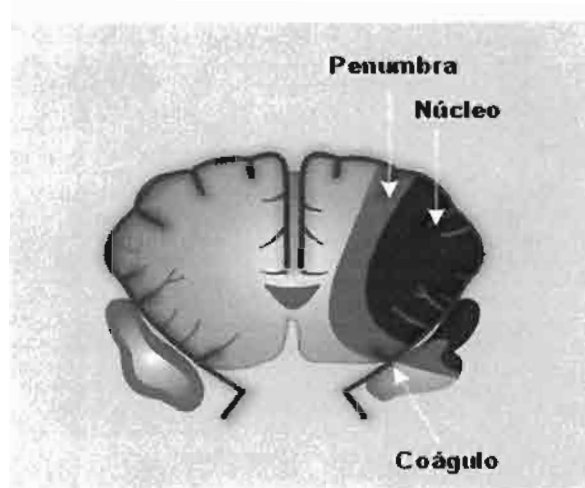


Figura 4. Ilustración esquemática de las dos zonas morfológicas secundarias a la privación del flujo sanguíneo cerebral.

La primera región es denominada núcleo isquémico donde el flujo sanguíneo cerebral disminuye a 10 ml/min/100 g de tejido que corresponde al $\leq 20\%$ del FSC normal y el daño neuronal puede ser irreversible después de 30 minutos, sus neuronas comienzan a perder gradientes iónicos, se despolarizan y mueren por procesos necróticos inmediatos. La segunda región localizada en la periferia del núcleo isquémico es denominada penumbra isquémica donde la reducción del flujo sanguíneo cerebral es hasta de 10 a 25 ml/min/100 g de tejido ($\leq 50\%$ del FSC normal) y la evolución a irreversible es menos rápida (Figura 5) (Dirnagl y col., 1999; Lipton, 1999). En sus neuronas se deteriora la habilidad para generar potenciales de acción pero se mantienen gradientes iónicos intactos hasta que la producción de trifosfato de adenosina (ATP) cae por debajo del 50% de sus niveles normales (Iadecola, 1999).

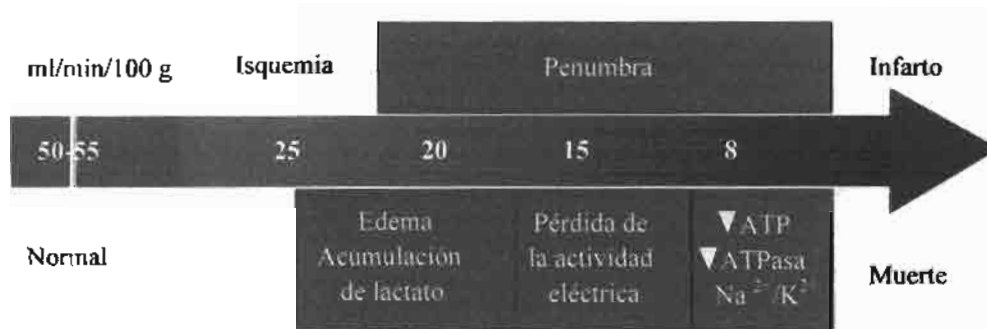


Figura 5. Efectos de la reducción del Flujo Sanguíneo Cerebral.

La penumbra es una zona potencialmente viable, en la que la integridad de la membrana celular se preserva y puede ser rescatada de su conversión a núcleo isquémico (Figura 6). Aún cuando es un fenómeno relativamente progresivo debido a la excitotoxicidad en curso o a un fenómeno deletéreo secundario como despolarización expansiva, inflamación post-isquémica, apoptosis o necrosis tardía; también es potencialmente previsible (Dirnagl y col., 1999; Sweeney y col., 1995).

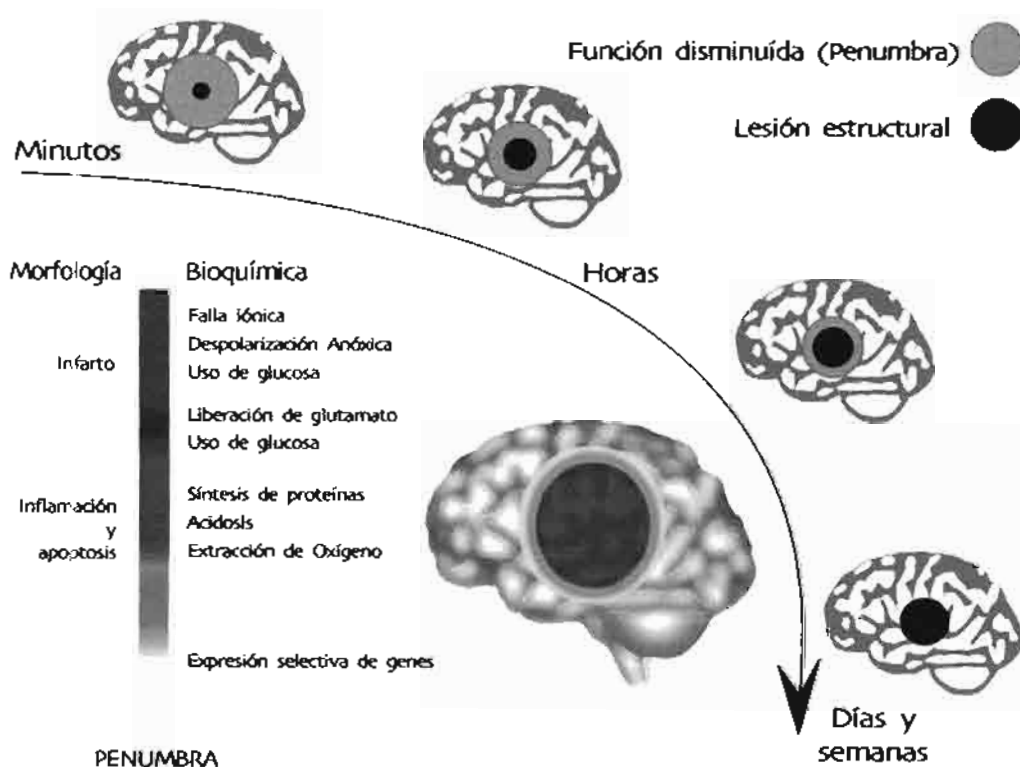


Figura 6. Ilustración esquemática de cómo la evolución de penumbra a núcleo isquémico ocurre con relación al transcurso del tiempo.

Lógicamente, el periodo de tiempo durante el cuál la penumbra persiste representa una ventana de oportunidad terapéutica potencial que depende fundamentalmente de la severidad de la isquemia, del flujo sanguíneo cerebral proveniente de colaterales, de la vulnerabilidad selectiva del tejido neuronal afectado y de factores sistémicos, tales como la glucemia sérica, la presión arterial sistémica y la temperatura corporal (Sweeney y col., 1995; Muñoz, 2001).

Aún cuando se reconoce que la prevención es el factor más importante para disminuir la incidencia de AVC y puesto que la destrucción ocasionada en el tejido cerebral, y de manera particular en las neuronas del núcleo isquémico es irreversible, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios que tratan de entender las vías intracelulares activadas durante la isquemia cerebral (Nathal y col., 1993). La finalidad de estas investigaciones es encontrar nuevas terapias, o incrementar la efectividad de las terapias ya establecidas, para reducir las consecuencias del evento isquémico, o incluso que se puedan rescatar a las neuronas aún viables que se localizan en la penumbra isquémica, convirtiéndola en el blanco principal de las estrategias neuroprotectoras (Dirnagl y col., 1999; Lee y col., 1999; Weinberger, 2000; Iadecola, 1999).

2.2.7 Eventos eléctricos en la isquemia.

En las primeras fases de la isquemia se observan diversas alteraciones en la electrofisiología cerebral: disminución de la amplitud, enlentecimiento de las señales electroencefalográficas espontáneas, y disminución de los potenciales evocados somatosensoriales. A medida que la isquemia progresa se producen fallo y silencio eléctricos. No todas las regiones cerebrales, ni todas las células del SNC presentan la misma vulnerabilidad selectiva frente a la isquemia (las neuronas son más sensibles que las células gliales como oligodendrocitos y astrocitos), por lo que el desarrollo de muerte celular e infarto puede tardar horas (Robbins y col., 2000). En varios tejidos del SNC un cambio bifásico del potencial de membrana es observado por la inhibición de la fosforilación oxidativa. La hiperpolarización transitoria es seguida por una despolarización terminal, finalmente irreversible (Riepe, 1997).

En isquemias simuladas utilizando modelos *in vitro* se observa una hiperpolarización de la membrana plasmática durante la privación de oxígeno/glucosa (OGD) (Banasiak y col., 2000; Lee y col., 1999; White y col., 2000). Tal hiperpolarización tendrá como consecuencia desactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje disminuyendo por tanto la concentración de calcio intracelular libre (Amoroso y col., 1990; Babenko y col., 1998; Jiang y col., 1994), previene el desbloqueo por magnesio que se presenta durante condiciones fisiológicas normales sobre los receptores a glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Amoroso y col., 1990; Lee y col., 1999; Michaelis, 1998). Si no existiera una hiperpolarización de la membrana plasmática en las neuronas de la penumbra, las situaciones de hipoxia/hipoglucemia, generarían la despolarización de la membrana neuronal facilitando la liberación de neurotransmisores, como el glutamato, hacia el medio extracelular y las sinapsis neuronales alcanzarían niveles tóxicos (Figura 6-A) (Kandel, 1991; Michaelis, 1998; Tymianski y col., 1993).

La despolarización inducida por la isquemia cerebral (hipoxia/hipoglucemia) denominada onda de despolarización o depresión expansiva (SD) fue descubierta por Leao en 1944 (Somjen y col., 1992). Branston presentó la primera evidencia de que la SD ocurre en tejido cerebral dañado (Branston y col., 1977). La SD es un fenómeno bien conocido que involucra una depresión transitoria del gradiente iónico en las células cerebrales y está acompañada por un aumento negativo del potencial extracelular por arriba de 30 mV de amplitud (Irwin y Walz, 1999). Tiene la forma de una onda concéntrica que se mueve a partir del área de supresión eléctrica (núcleo isquémico) hacia la periferia (penumbra) durante la isquemia a una velocidad de 1.5 a 7.5 mm/min (Kirino, 2002; Irwin y Walz, 1999).

En el área de SD ocurre despolarización masiva de neuronas y aumento en la concentración extracelular de potasio (entre 30 y 80 mM) (Kirino, 2002). Se observa al inicio un pequeño aumento, seguido por uno más rápido y mayor. Después de 1 a 2 minutos el K⁺ comienza a caer a valores normales (4 mM), el gradiente iónico se normaliza y las células se repolarizan al término de la onda SD (Somjen y col., 1992). Registros simultáneos en diferentes sitios muestran dos

tipos de ondas: 1 una despolarización donde la concentración de potasio aumenta al principio de 10 a 12 mM por varios minutos. La duración de esta fase es gobernada por el valor metabólico pre-isquémico y las reservas de glucosa disponible. Luego la concentración aumenta en segundos alrededor de 60 mM; 2 la onda de despolarización que ocurre cuando la concentración de potasio aumenta en segundos desde 3 hasta 60 mM sin la fase intermitente de 10 a 12 mM (Irwin y Walz, 1999).

El núcleo isquémico tiene una concentración extracelular de potasio aumentada como resultado de la depresión de gradientes iónicos (Nedergaard y col., 1986). La penumbra tiene una concentración extracelular de potasio normal pero un flujo sanguíneo reducido (Irwin y Walz, 1999) además existe un desajuste entre la demanda y el aporte de energía; durante y después de la onda de despolarización, lo cual es el principal contribuyente de la extensión del núcleo a la penumbra (Irwin y Walz, 1999; Sweeney y col., 1995).

Al mismo tiempo los iones de sodio, cloro y calcio se mueven al interior celular (Kraig y col., 1978). También se abren canales iónicos, con diámetros mayores a 0.6 nm, que son permeables a bicarbonato y moléculas de agua. (Phillips y Nicholson, 1979). Además, la onda SD produce la dilatación de vasos sanguíneos y en consecuencia, el flujo sanguíneo, la oxidación mitocondrial y la producción de lactato aumentan (Lothman y col., 1975). La onda SD puede propagarse aún si la conducción axónica y la transmisión sináptica están completamente bloqueadas (Herrerías y Somjen, 1993). Después de que una onda pasa por una área, el tejido otra vez vuelve a ser normal por un corto tiempo, y aunque ocurran varias SD subsecuentes no dañan la estructura ni la función neuronal. (Somjen y col., 1992). Ahora está claro que la onda SD puede suceder en cualquier región del cerebro afectando neuronas y astrocitos. Se ha demostrado que un estímulo mecánico (trauma), eléctrico (convulsiones) o químico (glutamato, cloruro de potasio concentrado) puede disparar el inicio de la onda SD (Bures y col., 1974).

Durante la isquemia hay un aumento extracelular de potasio que contribuye

al daño por (Figura 7) (Juurlink y Sweeney, 1997):

- Despolarización de la membrana celular aumentando el influjo de calcio.
- Aumentando el consumo de ATP por la activación de las bombas de Ca^{2+} y Na^+ .
- Aumentando la síntesis y liberación de glutamato, abriendo canales de calcio que a su vez aumentan el influjo de calcio estableciéndose así un círculo vicioso.

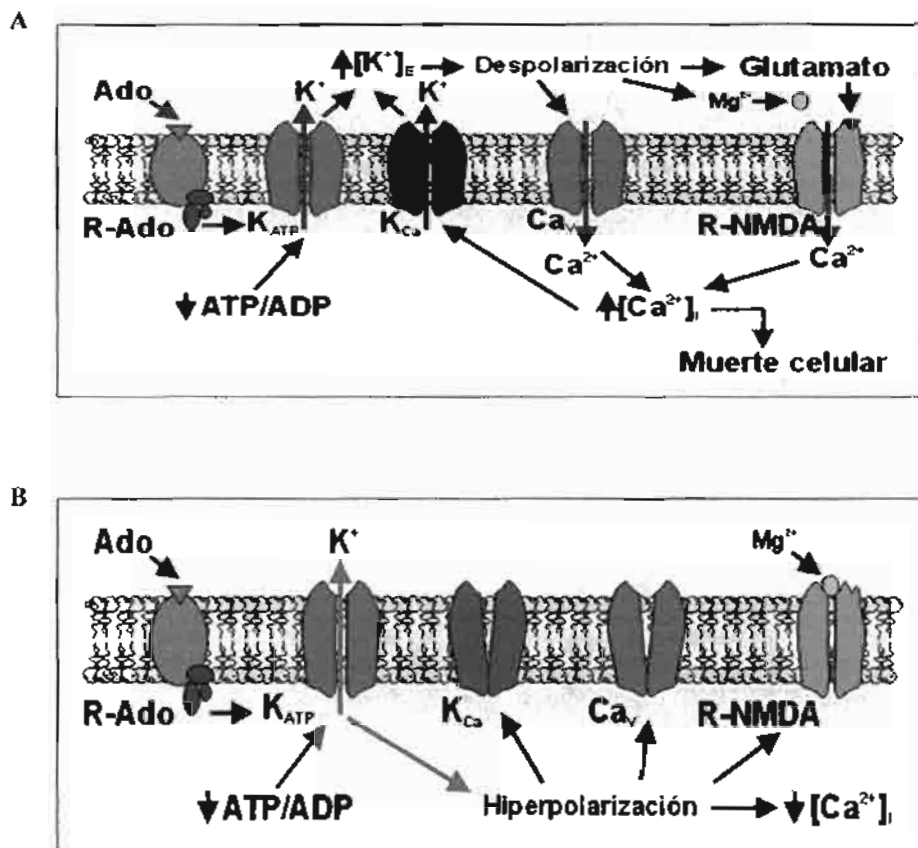


Figura 7. Ilustración esquemática de los cambios eléctricos que suceden en la membrana plasmática durante un evento isquémico. Un cambio bifásico del potencial de membrana es observado por la Inhibición de la fosforilación oxidativa. La hiperpolarización transitoria (A) es seguida por una despolarización terminal (B).

2.2.8 Eventos bioquímicos en la isquemia

Astrup y colaboradores en 1977 propusieron el concepto de umbral de viabilidad de la isquemia. Encontraron que cuando el FSC cae una tercera parte del nivel normal, hay pérdida de la excitabilidad eléctrica (Astrup y col., 1977) sin embargo, la homeostasis iónica no se pierde hasta que el FSC cae más allá de

una cuarta parte del valor normal (FSC de 12.5 a 13.75 ml/min/100 g de tejido) (Sweeney y col., 1995). A nivel molecular la disminución del FSC se expresa por aumento en la extracción de oxígeno, mayor demanda de glucosa y acidosis láctica. Durante la isquemia cerebral, las fuentes de almacenamiento del ATP se ven rápidamente reducidas, los sistemas de transporte activo (como las bombas de calcio, sodio y potasio) siguen funcionando por un cierto tiempo, contribuyendo a la depresión de las reservas de energía intracelular (Lee y col., 1999; Lipton, 1999; Sweeney, 1997, White y col., 2000). Las bombas de calcio de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico se mantienen activas para conservar la concentración de calcio intracelular en niveles fisiológicos conservando la concentración de calcio libre en un valor cercano a 100 nM (Banasiak y col., 2000; Brini y Carafoli, 2000). Se ha demostrado que incrementos en la concentración intracelular de calcio libre promueven la muerte neuronal ya sea por procesos necróticos o apoptóticos (Brini y Carafoli, 2000; Banasiak y col., 2000; Lipton, 1999; Tymianski y col. 1993; White y col., 2000). Así mismo las bombas de sodio y potasio localizadas en la membrana plasmática contribuyen al consumo de ATP para mantener el potencial eléctrico de la membrana y los gradientes iónicos (Banasiak y col., 2000; Dimagl y col., 1999). Así, con la entrada masiva de Ca^{2+} al espacio intracelular y la pérdida del gradiente iónico, se produce una despolarización permanente de la membrana celular.

Inmediatamente después se presenta una acidosis y la liberación pre-sináptica excesiva del neurotransmisor aminoácido glutamato el cuál se une a sus receptores del tipo NMDA generando su activación y un mayor influjo de calcio, cuando éstos se encuentran desbloqueados por el magnesio al ser removido por la despolarización de la membrana. Estos hechos conducen a una circunstancia en la cuál, además de los efectos dañinos generados por el compromiso metabólico celular, se genera un mayor daño neuronal debido a la excitotoxicidad del glutamato (Amoroso y col., 1990; Dimagl y col., 1999; Lee y col., 1999; Michaelis, 1998; Simon, 1984). Otras alteraciones del flujo iónico se producen por interacción del glutamato con sus receptores Kainato y α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA). Un esquema resumido puede verse en la Figura. 8:

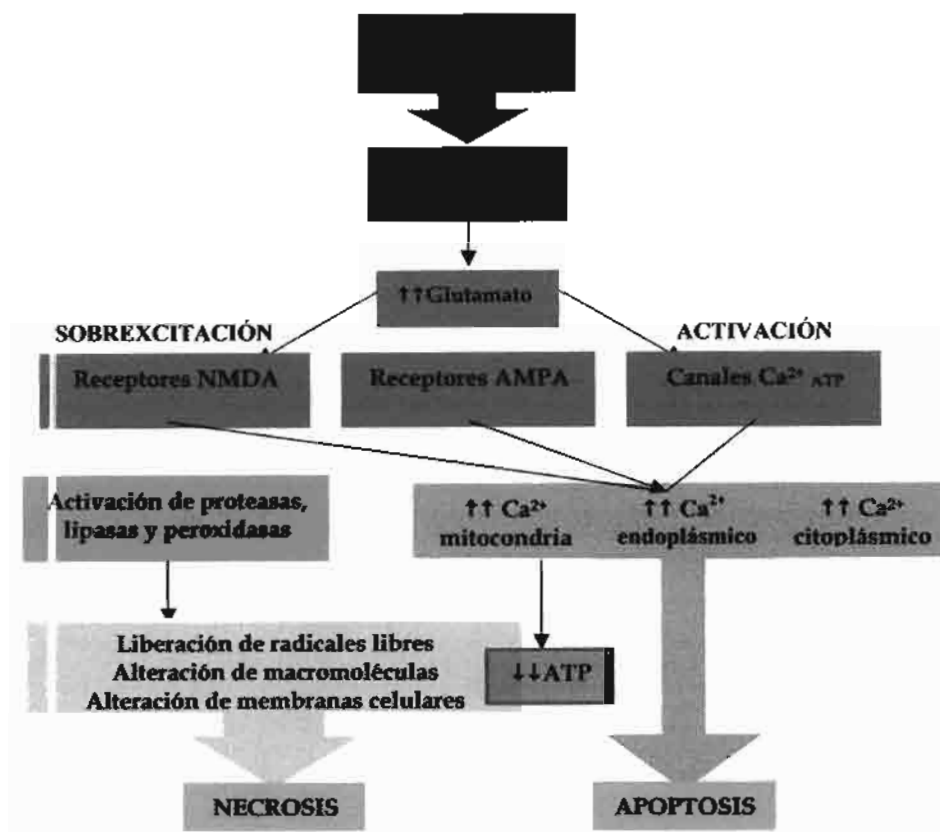
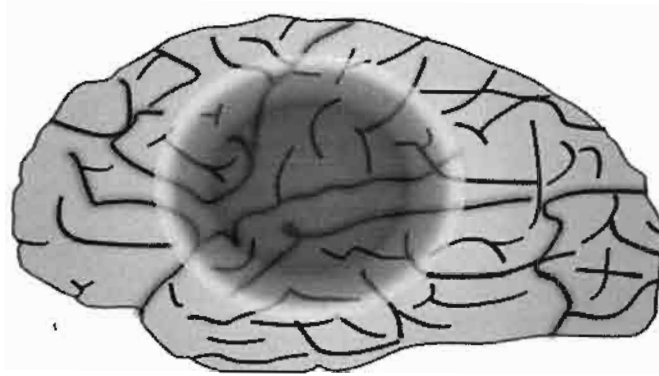


Figura 8. Secuencia de los principales eventos fisiopatológicos como consecuencia de un infarto cerebral (Arango-Dávila y col., 2004).

La caída de ATP intracelular antes mencionada favorece la activación de los canales de potasio sensibles al ATP, que en condiciones metabólicas normales se encuentran cerrados por la presencia de concentraciones elevadas de ATP intracelular (Aguilar-Bryan y Bryan, 1999; Babenko y col., 1998). Otra situación importante es un aumento en la concentración de adenosina extracelular debido a la hidrólisis del ATP, aumentando la probabilidad de interacción con sus receptores de adenosina del tipo A₁ (Sweeney, 1997). Durante el periodo inicial después del infarto se activan programas genéticos complejos, algunos son involucrados en los procesos celulares que determinan el daño isquémico como la formación de citoquinas y otros factores que por su parte causan inflamación adicional y el compromiso microcirculatorio; mientras que otras moléculas coordinan procesos de reparación del tejido (Iadecola, 1999). Adicionalmente, los

radicales libres (superóxido, perhidroxilo, hidroxilo, peróxido de hidrógeno) inician peroxidación lipídica que da como resultado la destrucción nuclear neuronal.

Otros cambios bioquímicos que se detectan durante la isquemia cerebral incluyen la acumulación de ácidos grasos libres y la metabolización de fosfolípidos. Muchos de los ácidos grasos libres derivan de lípidos de membrana que son degradados como resultado de la activación de lipasas y fosfolipasas. Algunas de ellas, como la fosfolipasa A₂, son dependientes de calcio y por tanto pueden activarse en situaciones de isquemia. Además uno de los parámetros más sensible a reducciones de flujo sanguíneo cerebral es la síntesis proteica que se inhibe profundamente durante la isquemia, ya sea focal o global, a pesar de que no se observan cambios en la morfología de los polirribosomas que permanecen agregados durante el periodo de la isquemia. Ello impide la nueva síntesis de proteínas que, de prolongarse durante suficiente tiempo, podría provocar un déficit en proteínas esenciales para la supervivencia celular (Planas, 1997). Finalmente con la suma de los eventos intracelulares y extracelulares mencionados, las neuronas localizadas en el núcleo isquémico morirán por un proceso necrótico en un lapso corto de tiempo (segundos), mientras que las neuronas localizadas en la penumbra podrán morir por procesos apoptóticos si este mecanismo es activado durante la isquemia (Figura 9) (Banasiak y col., 2000; Dirnagl y col., 1999; Lipton, 1999).



Morfología	Núcleo	Bioquímica
Infarto		Falta iónica Despolarización anórica Consumo de glucosa ↓
	Penumbra	Liberación de glutamato Consumo de glucosa ↑
Edema y apoptosis		Síntesis proteica ↓ Acidosis Extracción de oxígeno ↑ Expresión selectiva de genes

Figura 9. Esquema de la evolución en los cambios bioquímicos respecto a los cambios morfológicos que ocurren después del evento isquémico. Modificada de Dirnagl y col., 1999.

2.2.9 Reperusión.

El objetivo central de la terapia en la isquemia es conservar la penumbra. Esto se puede llevar a cabo, limitando la severidad del daño isquémico es decir, protección neuronal; o reduciendo la duración de la isquemia, es decir restaurando el flujo de sangre al área comprometida. La terapia de "nueva perfusión" o reperusión busca mejorar el flujo sanguíneo del tejido después de la isquemia. El aumento del flujo colateral al cerebro isquémico también puede ser efectivo en la reducción del daño. La duración de la "ventana de oportunidad" en la cual la reperusión es benéfica está limitada a las primeras horas seguidas a la inducción de la isquemia. La reperusión varias horas después de la instalación de la isquemia es deletérea y permite la hemorragia cerebral y la mortalidad aumentada (Iadecola, 1999). Si la oclusión arterial es liberada, el FSC regresa al territorio isquémico.

Inicialmente, después de la reperusión hay una fase de flujo aumentado (hiperemia post-isquémica) seguida por un largo periodo de flujo reducido (hipoperfusión post- isquémica). La hiperemia ha sido atribuida a la liberación de

metabolitos vasoactivos, desde el cerebro isquémico, así como a la disminución de la viscosidad sanguínea (Hossmann, 1993).

La hipoperfusión post-isquémica resulta de la depresión metabólica cerebral que sigue a la isquemia y a la obstrucción microvascular (Iadecola, 1998). El re-establecimiento del flujo arterial sólo repara el tejido previamente isquémico. Tal reperfusión incompleta nombrada fenómeno de “no reflujo” (Ames y col., 1968) ha sido atribuida a múltiples factores que incluyen: aumento de la viscosidad sanguínea, coagulación intravascular, oclusión microvascular por inflamación de astrocitos que rodean los capilares cerebrales, lesión intracraneal aumentada, inflamación endotelial, formación de microvellosidades endoteliales e hipotensión post-isquémica. La reperfusión incompleta limita la supervivencia del tejido post-isquémico porque impide la restauración completa de flujo al territorio isquémico. La elevación de la presión arterial, la hemodilución y el control del equilibrio ácido-base en el periodo post-isquémico minimiza el fenómeno de “no reflujo” y facilita la recuperación funcional del cerebro isquémico (Hossmann, 1993). Además hay procesos patogénicos que se desarrollan varias horas o aún días después de la inducción de la isquemia.

Los mecanismos que permiten el daño isquémico cerebral son múltiples y actúan a diferentes tiempos después de la isquemia dependiendo de la región del infarto. La neuroprotección primaria está dirigida al incremento de la resistencia neuronal a la isquemia contrarrestando el efecto de los mediadores involucrados en la iniciación de la cascada isquémica. En la neuroprotección secundaria los tratamientos que limitan la reacción inflamatoria que involucra la isquemia cerebral reduce el daño, como inhibidores de enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) o ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) inducidas por la inflamación (Iadecola, 1999).

Varias maniobras terapéuticas han demostrado sus bondades experimentales tratando de abortar en algún punto la cascada isquémica reduciendo hasta el 50% el daño cerebral después de la oclusión arterial; tal como la hemodilución, la hipotermia ligera (32°C aproximadamente), inhibidores de aminoácidos excitatorios, antagonistas de calcio, bloqueadores de canales de

sodio, inhibidores de peroxidación lipídica, limpiadores de radicales libres y antagonistas del factor de activación plaquetario (PAF), sin embargo son eficaces sólo si se administran en etapas tempranas de la isquemia cerebral (Sweeney y col., 1995; Iadecola, 1999). Una terapéutica inexplorada es el aumento potencial en la recuperación funcional del cerebro promoviendo la plasticidad neuronal y glial, y acelerando el proceso de reparación del tejido. La combinación de diferentes modalidades terapéuticas aumenta el efecto protector o extiende la ventana de oportunidad. Incluye antagonistas de receptores NMDA combinado con antagonistas del calcio, trombolisis o hipotermia post-isquémica (Iadecola, 1999).

La reperfusión del tejido isquémico cerebral es crítica para restaurar la función normal. Sin embargo, este reflujo de sangre puede producir paradójicamente una destrucción progresiva de células reversiblemente dañadas (penumbra isquémica), así conduciendo a disfunción del tejido e infarto. Este "daño por reperfusión" tiene una etiología multifactorial, pero parece tener una fuerte relación con una respuesta inflamatoria mediada por interleucinas (ILs), una subclase multifuncional de citocinas. Los leucocitos también parecen desempeñar un papel crítico en el daño por reperfusión incluyendo lo siguiente:

- Adherencia de leucocitos e infiltración.
- Obstrucción de la microcirculación directamente.
- Liberación de radicales libres.
- Daño de la membrana neuronal, que puede producir más radicales libres.

Este taponamiento del vaso capilar por leucocitos también puede ser el mecanismo principal del fenómeno de "no reflujo". Así los dos mecanismos más importantes del daño por reperfusión en la isquemia son: la respuesta de citocinas y la adherencia de leucocitos. (Clark, 2005). La muerte neuronal puede suceder por apoptosis o necrosis. La apoptosis es la "muerte programada" donde las células mueren de manera controlada en respuesta a la activación de programas genéticos específicos y requiere de energía; en cambio, la muerte por necrosis responde a las células con pérdida de ATP acompañada de aumento intracelular

de calcio que resulta en la pérdida completa de su habilidad para regular procesos homeostáticos. La apoptosis es una forma de muerte neuronal tardía, es más extensa de lo que se creía, lo que sugiere que se pueden utilizar drogas anti-apoptóticas como inhibidores caspasa, durante la reperfusión y así disminuir el tamaño del infarto (Sweeney y col., 1995; Juurlink y Sweeney, 1997; White y col., 2000; Tanaka y col., 2004; Riksen y col., 2004). La isquemia interrumpe la integridad de la membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de citocromo C y la activación de caspasas (9 y 3) implicadas en la ejecución de la apoptosis. McLaughlin y colaboradores en el 2003, observaron la activación de la caspasa 3 sin muerte celular del tejido preconditionado. En un modelo *in vitro* donde se observó la activación de la caspasa 3, los autores mostraron la aplicación de un inhibidor y la inducción de proteínas *stress* (McLaughlin y col., 2003).

Varias condiciones fisiológicas, patológicas y ambientales pueden inducir una familia de proteínas asociadas con replicación de DNA, retención de proteínas en el retículo endoplásmico y transporte de proteínas a través de la membrana, llamadas proteínas *stress* o proteínas heat shock (HSPs). Una cantidad aumentada de estas hace que las células sean resistentes a un estrés subsecuente; esta reacción es llamada "respuesta estrés". Si bien la respuesta al estrés puede ser el mayor componente del preconditionamiento en el cerebro, las neuronas parecen ser protegidas por mecanismos divergentes de inducción a la tolerancia. La señalización por proteínas cinasas, los genes tempranos inmediatos, factores de crecimiento y enzimas de defensa antioxidante son ejemplos de tal respuesta (Kirino, 2002).

2.3 NEUROPROTECCIÓN Y PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO.

El preconditionamiento isquémico (PI), también conocido como tolerancia isquémica es un término utilizado para explicar un fenómeno en el cuál el tejido expuesto a un periodo de isquemia breve, activa mecanismos endógenos reduciendo el daño celular que podría ser ocasionado por eventos isquémicos subsecuentes más prolongados, concretamente una estrategia endógena para proteger a un órgano (González-Zulueta y col., 1999; Pagliaro y col., 2000; Dawson y Dawson, 2000; Raffan y Kling, 2000; Planas, 2000).

En 1981, comenzó a hablarse del preconditionamiento isquémico cuando Reimer (Reimer y col., 1981) estudió la contribución del ATP en el origen del daño al miocardio en un modelo experimental que implicaba la producción de una serie de breves episodios isquémicos, encontrando que existía una disminución inicial del contenido de ATP durante el primer episodio isquémico mas no en los episodios restantes además que; en algunos de sus animales no se observaba infarto. Posteriormente Murry y colaboradores (Murry y col., 1986) basándose en los resultados de Reimer, realizó una serie de experimentos (4 periodos secuenciales de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión momentos previos al sometimiento del miocardio a una isquemia prolongada de 40 minutos de duración), paradójicamente encontró que esos periodos isquémicos fueron muy breves como para ocasionar necrosis por sí mismos sin embargo redujeron grandemente el tamaño del infarto generado durante la oclusión sostenida subsiguiente; de un 30% esperado de región afectada a sólo 7% (Cohen y col., 2000; Yellon y Dana, 2000; Riksen y col., 2004) así nació el concepto de “precondicionamiento o preacondicionamiento isquémico”.

Luego de esta primera descripción del fenómeno, el preconditionamiento fue observado en una amplia variedad de modelos experimentales (corazón aislado, animales anestesiados a tórax abierto y cerrado, animales conscientes y cultivos de miocitos y de neuronas) y en especies muy diferentes tales como perros, ratas, conejos, ratones, cerdos, gerbos, ovejas y humanos (Del Valle y col., 2003; Pong, 2004). Posteriormente se descubrió que el preconditionamiento puede inducir

tolerancia isquémica en una variedad de órganos sistémicos incluyendo cerebro, corazón, hígado, intestino delgado, músculo esquelético, riñón y pulmón (González-Zulueta y col., 1999; Pagliaro y col., 2000; Dawson y Dawson, 2000). Se conoce que el cerebro es particularmente vulnerable a la isquemia. Aún un breve insulto isquémico de pocos minutos puede matar cierta población de neuronas como las CA₁ de hipocampo. Kitagawa y colaboradores (Kitagawa y col., 1990) fueron los primeros en demostrar el fenómeno del preconditionamiento isquémico neuronal *in vivo* mediante la oclusión simultánea de ambas carótidas comunes en gerbos, se llevó a cabo una sola isquemia preconditionante y tres días después, una segunda isquemia letal de mayor duración (Kirino, 2002). Fue demostrado por Heurteaux (Heurteaux y col., 1995) que el preconditionamiento isquémico protege contra la isquemia letal cuando se aplica con un intervalo de tiempo de tres días pero empeora el daño cuando se aplica con un intervalo de una hora (Riepe y col., 1997).

Hasta la fecha el preconditionamiento cardíaco ha sido el más estudiado y esto ha permitido conocer las diferentes vías de señalización que se activan y dan como resultado final la protección del tejido, el estudio del preconditionamiento isquémico cerebral no se ha quedado atrás y actualmente se sabe que comparte varias vías de señalización o mecanismos similares a los que ocurren en tejido cardíaco, entre ellos: la activación de los receptores de adenosina A₁, canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) y el papel del óxido nítrico (NO) (Dawson y Dawson, 2000).

El PI responde a las características de un fenómeno bifásico, con una primera fase denominada "preconditionamiento clásico", "temprano" o "primera ventana de oportunidad"; que se desarrolla pocos minutos después de breves episodios isquémicos y desaparece dentro de las 2 a 4 horas después del estímulo preconditionante y una segunda fase el "preconditionamiento tardío" o "segunda ventana de oportunidad" propuesta por Yellon y Baxter en 1995 (Yellon y Baxter, 1995) que comienza a desarrollarse dentro de las 12 a 24 horas siguientes al estímulo y que puede durar hasta 72 horas (Del Valle y col., 2003; Riksen y col., 2004; Sweeney y col., 1995; Pagliaro y col., 2000).

El preconditionamiento isquémico temprano es iniciado por una interacción receptor-ligando, y la subsiguiente activación de los receptores de la proteína G (PG), (Xuan y col., 1999) es independiente de la síntesis de proteínas, es mediado por modificaciones proteicas post-traduccionales y dura poco (Dawson y Dawson, 2000). En cambio el preconditionamiento isquémico tardío implica un complejo sistema de transducción de señales que estimulan la síntesis de diversas enzimas y proteínas efectoras (Xuan y col., 1999) los efectos del preconditionamiento tardío requieren nueva síntesis proteica y son sostenidos por un periodo de días a semanas (Dawson y Dawson, 2000).

Algunos de los mediadores que actúan en el PI temprano (dentro de las 2 a 4 horas) son la noradrenalina, la adenosina, el NO y los radicales libres mismos que producen a tiempos más largos (2 a 3 días) activación de distintas proteínas cinasas, tales como proteína cinasa C (PKC), tirosina-cinasa (TK), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y factor nuclear kappa B de transcripción (NF-kB) que aumentan la expresión de genes que conducen a la síntesis de proteínas tales como las antioxidantes, las HSPs y iNOS. Estas proteínas son las responsables de la protección tardía del preconditionamiento isquémico. La segunda ventana de oportunidad es menos potente que la primera y además se cree resulta de la inducción de una proteína protectora (Cohen y col., 2000). En el corazón la tolerancia inducida por el preconditionamiento es casi inmediata y declina rápidamente dentro de pocas horas, en cambio en el cerebro la tolerancia inducida es del tipo tardío lo que representa una diferencia marcada entre estos órganos (Kirino, 2002). El cerebro puede ser potencialmente rescatado del infarto muchas horas después de instalada la isquemia y afrontar la noción general de una "ventana de oportunidad terapéutica" de 3 hasta 6 horas (Iadecola, 1999). Adicionalmente las dos distintas formas de preconditionamiento temprano y tardío; son observadas en ambos sistemas cardiaco y nervioso. (Dawson y Dawson, 2000).

El preconditionamiento es un fenómeno reproducible, pero sus mecanismos aún no son completamente comprendidos. Protege neuronas y al mismo tiempo preserva la función cerebral. Corbett y Crooks (Corbett y Crooks, 1997) al igual

que Ohno y Watanabe (Ohno y Watanabe, 1996) evaluaron la tolerancia isquémica con respecto a la memoria y sus resultados sugirieron una correlación directa entre muerte neuronal en el hipocampo y el daño en el aprendizaje y la memoria (Pong, 2004). La tolerancia proporcionada por el preconditionamiento podrá aumentar o disminuir dependiendo de la duración, el intervalo y el número de episodios de insultos isquémicos (Kirino, 2002; Riepe y Ludolph, 1997).

Es importante realzar que la naturaleza del estímulo preconditionante (duración, intervalo y número de episodios) influye no sólo en la cantidad de protección sino también en las vías de señalización involucradas. La más importante diferencia entre el preconditionamiento temprano y tardío con respecto a la fase de disparo es que, en la tardía el NO endógeno provee protección retrasada contra el infarto (Riksen y col., 2004).

Otros tipos de preconditionamiento han sido descritos *in vivo* e *in vitro*, incluyendo: químico por bloqueo de la cadena respiratoria en el ciclo de Krebs, hipoxia, hipotermia, hipertermia, glutamato, convulsiones, ácido linoléico, lipopolisacáridos, toxinas mitocondriales, eritropoyetina, trombina, factor de necrosis tumoral, desferroxamina y cobalto; entre otros (Sharp y col., 2004; Gustavsson y col., 2004; Tanaka y col., 2004). Un número de mecanismos y moléculas han sido relacionados con varios tipos de preconditionamiento; estos incluyen: receptores A₁ de adenosina, canales K_{ATP}, NF-κB, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor inducible de hipoxia (HIF), sintasa de óxido nítrico (NOS), receptores NMDA, factor de necrosis tumoral, lactato entre otros.

Desafortunadamente no se ha demostrado su aprovechamiento sistémico para comprender los mecanismos del preconditionamiento (Sharp y col., 2004). También la isquemia preconditionante es capaz de proteger células y órganos lejanos, los cuáles no han sido preconditionados por sí mismos denominado "preconditionamiento remoto", "inter-órganos" o "a distancia". Estudios en ratas, conejos y cerdos han reportado este tipo de preconditionamiento en intestino y riñón pero no en cerebro (Riksen y col., 2004). Otro tipo de preconditionamiento es la "tolerancia cruzada", la cuál implica que el estímulo nocivo pueda conferir

tolerancia a un estímulo subsecuente que es diferente en naturaleza al primero (Kirino, 2002).

2.3.1 Eventos bioquímicos del preconditionamiento.

Los estudios sobre preconditionamiento sugieren que en su desarrollo están involucrados fenómenos de unión ligando-receptor. La isquemia preconditionante genera la liberación de un "disparador" (adenosina, opioides, bradiquinina, noradrenalina), que actúa sobre "mediadores", un receptor de membrana o sistemas acoplados a los mismos (radicales libres, PG) el que a su vez desencadena una serie de eventos intracelulares en paralelo o en cascada con PKC, TK o MAPK, activando genes específicos (genes tempranos inmediatos) que finalmente derivan en la síntesis o translocación de una proteína citoprotectora, la cuál podría ser el "efector final" o actuar sobre "efectores de membrana" (canales K_{ATP}) para desencadenar la protección contra el daño isquémico. (Figura 10) (Del Valle y col., 2003; Arango-Dávila y col., 2004).

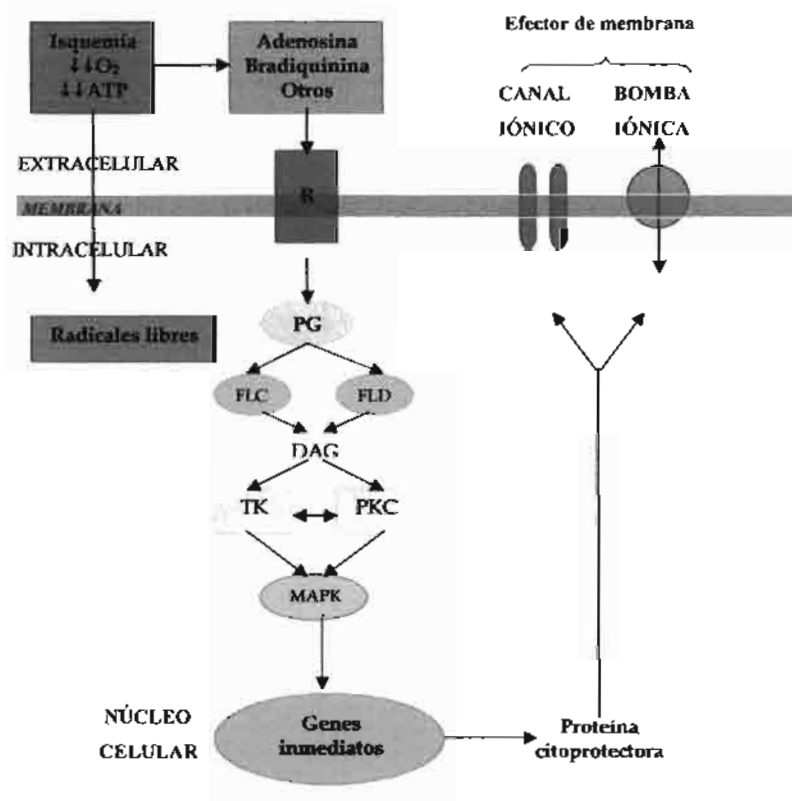


Figura 10. Eventos bioquímicos involucrados en el Precondicionamiento Isquémico. Modificada de Del Valle y col., 2003.

En el SNC, diversos estímulos del preconditionamiento han sido identificados, pasando desde episodios breves de isquemia, ondas de despolarización extensiva inducida por potasio, inhibición química de la fosforilación oxidativa, así como; exposición a excitotoxinas y citoquinas. En la neuroprotección participan, varios factores: calcio, glutamato, ATP, adenosina, canales K_{ATP} , especies reactivas de oxígeno y PKC, entre otros.

- **Calcio.**

El calcio normalmente entra a la célula a través de uno de los tres tipos de canales de calcio (designados como L, T y N) o a través de canales en los receptores a L-glutamato (Nathal y col., 1993). Neuronal, humoral u otro estímulo, incluyendo la despolarización de la membrana, ocasionan influjo aumentado de calcio a la célula (Tanaka, 2001). El aumento citosólico de calcio inicia una amplia variedad de procesos dependientes de calcio, que directa o indirectamente contribuyen al deceso de las neuronas afectadas (Iadecola, 1999). Este aumento masivo se debe principalmente al influjo a través de canales de voltaje (L, T, N) y de ligando (L-glutamato) y tiene consecuencias como:

- Activación de enzimas hidrolíticas dependientes del calcio.
- Activación de vías de segundos mensajeros.
- Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.

Así como la elevación del calcio intracelular permite la muerte celular también la disminución por debajo del nivel normal (10^{-4} mM) puede ocasionar la muerte apoptótica neuronal. Los efectos neuroprotectores de los factores de crecimiento, citoquinas y aún formas secretadas de precursores proteínicos β amiloideo parecen ser mediados por mecanismos facilitadores que permiten a la célula estabilizar los niveles de calcio (Sweeney y col., 1995).

- **Glutamato.**

Es el principal aminoácido neurotransmisor excitatorio del SNC y actúa a través de dos clases de receptores de membrana: Ionotrópicos, denominados según los diferentes agonistas farmacológicos NMDA, AMPA, y Kainato que se



activan por ligandos y Metabotrópicos de glutamato (mGluR) los cuáles están unidos a efectores celulares a través de proteínas ligadas a trifosfato de guanosina (GTP) (White y col., 2000). Los de Kainato y AMPA son también conocidos como no-NMDA, son permeables a cationes monovalentes (Na^+ , K^+ , e H^+), mientras que el canal regulado por NMDA lo es al Ca^{2+} (Nathal y col., 1993; Nishizawa, 2001).

El glutamato contribuye en el daño neuronal en patologías desde desórdenes degenerativos agudos tales como infarto o trauma cerebral hasta enfermedades degenerativas como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, Huntington y Alzheimer. La concentración extracelular de glutamato se eleva rápidamente durante la despolarización inducida por el aumento masivo y prolongado de calcio intracelular y la reducción de su consumo; la concentración declina después de la reperfusión (Nishizawa, 2001). Inicialmente el flujo aumentado de glutamato es debido a un proceso mediado por el Ca^{2+} a través de uno de los tres tipos de canales dependientes de voltaje. Posteriormente es independiente del Ca^{2+} (Nathal y col., 1993) y ahora es mediado por la activación de receptores NMDA que abre canales de calcio, permitiendo el influjo de calcio, y la de los receptores AMPA abre canales de sodio permitiendo su entrada. El aumento de la concentración de sodio intracelular induce la extrusión normal de calcio a través de anti-transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, resultando nuevamente en un aumento de calcio (de aproximadamente 70 nM a 30 μM) y el influjo de calcio por sí mismo estimula la liberación de glutamato desde las vesículas sinápticas (White y col., 2000).

La excitotoxicidad por glutamato juega un papel importante en el daño neuronal causado por la isquemia *in vivo* e *in vitro*. El flujo aumentado de glutamato inducido por la isquemia es inhibido por tetrodotoxina y un antagonista no competitivo del receptor NMDA (ketamina, dizocilpina) (Nathal y col., 1993), mientras que la inhibición de la liberación de glutamato es menos marcada con antagonistas competitivos del receptor NMDA. Los bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje producen un efecto mayor sobre la concentración extracelular de glutamato cuando se emplean en combinación (Nishizawa, 2001). Numerosos estudios han investigado el papel de neurotransmisores como glutamato y el ácido-gamma-amino-butírico (GABA) y sus receptores respectivos



en la inducción del preconditionamiento isquémico. Más específicamente la activación del receptor GABA unido a la reducida liberación de glutamato y la modulación de receptores AMPA contribuyen a la neuroprotección que sigue al preconditionamiento (Pong, 2004).

- **Trifosfato de adenosina (ATP).**

La función más importante de las mitocondrias es la generación de ATP, por la transferencia de electrones al oxígeno. Esta transferencia está asociada con la transferencia de iones H^+ desde el interior al exterior de la membrana interna mitocondrial, y así estabilizar el potencial transmembrana mitocondrial. Subsecuentemente el flujo pasivo entrante de iones H^+ forma las fuerzas por la reducción de ATP. Durante la transferencia del 1 al 5% de iones pierden su camino y participan en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Riksen y col., 2004). El ataque de isquemia induce disfunción mitocondrial, alteraciones en niveles de energía, actividad metabólica, generación de radicales libres y actividad pro-apoptótica que delinean la patología celular, la cuál permite el inevitable daño tisular y muerte celular. Dave y colaboradores en el 2001 (Dave y col., 2001) sugirieron que el PI protege la fosforilación oxidativa mitocondrial después de la isquemia (Pong, 2004). La interrupción del FSC resulta en la caída del ATP celular por la reducción de la fosforilación oxidativa a medida que disminuye el oxígeno, y alcanza niveles de cero dentro de aproximadamente 4 minutos de isquemia completa. Las neuronas sujetas a una isquemia severa no pueden mantener los gradientes iónicos debido a una falla en la ATPasa de Na^+ - K^{2+} y otras bombas iónicas dependientes de energía. La alteración de los niveles de energía es probablemente el mecanismo predominante de la muerte celular en el núcleo isquémico. En la penumbra, donde la reducción del flujo es suficiente para ocasionar una rápida falla energética, otros mecanismos son los responsables del daño neuronal (sobrecarga de calcio, excitotoxicidad por glutamato, daño por radicales libres). La depleción de ATP ocasiona disminución del flujo de adenosina, además es asociada con despolarización e incremento en el calcio intracelular, inicia una cadena de eventos incluyendo lipólisis durante la isquemia seguida del metabolismo de ácidos grasos libres y generación del radical

superóxido durante la reperfusión. Los poros de transición para la permeabilidad mitocondrial se abren durante la reperfusión característicamente por la alta concentración de calcio mitocondrial, el estrés oxidativo, la depleción de ATP y la despolarización mitocondrial todas presentes durante la reperfusión (Riksen y col., 2004). Durante la reperfusión post-isquémica aún después de un periodo isquémico por arriba de 1 hora la carga de fosfatos de alta energía se recupera rápidamente y alcanza el valor normal dentro de los 15 minutos de la reperfusión (White y col., 2000).

- **Adenosina.**

Los disparadores de la protección son liberados durante la isquemia preconditionante breve y ejercen su actividad sólo durante este periodo, mientras que los efectores finales son activos sólo durante la isquemia prolongada y generan protección cuando es requerida. El primero y probablemente el más importante disparador del preconditionamiento temprano identificado es el nucleósido de adenosina endógeno (Riksen y col., 2004). La adenosina, un neuromodulador inhibitorio del SNC, se libera al espacio extracelular como una sustancia endógena neuroprotectora durante la hipoxia/isquemia (Heurteaux y col., 1995). La adenosina se forma rápidamente durante la isquemia como resultado a la ruptura intracelular del ATP, y es subsecuentemente transportada al espacio extracelular (Shang y Cheng, 2000). Se han caracterizado tres subtipos de receptores a adenosina: A₁, A₂ y A₃ (Cohen y col., 2000). En 1991 fue descubierto que la estimulación del receptor A₁ de adenosina es esencial para que ocurra la protección y la administración intravenosa de agonistas selectivos del receptor A₁ ofrece una protección similar (preconditionamiento farmacológico) (Thornton y col., 1992). Luego se encontró que *in vitro* e *in vivo*, la estimulación del receptor A₃ también contribuye al PI (Riksen y col., 2004). Al menos en el miocardio de conejo los receptores A₁ y A₃ están involucrados en el inicio de la protección. El receptor A₁ se involucra en PI en otras especies, perros, cerdos y ratas (Cohen y col., 2000). En el cerebro la adenosina actúa a través de dos subtipos de receptores A₁ y A₂, localizados en las neuronas y células gliales. Hay una muy alta densidad de receptores A₁ en el hipocampo, una área con

vulnerabilidad específica a la isquemia (Shang y Cheng, 2000). En el preconditionamiento isquémico, la producción aumentada de adenosina y a su vez la activación de los receptores A₁, es considerada el punto principal de una cascada de señalización intracelular que incluye: proteínas G, fosfolipasa C (FLC), fosfolipasa D (FLD), PKC y canales K_{ATP} permitiendo la protección temprana (Pagliaro y col., 2000; Pong, 2004) en la mayoría de los modelos experimentales y en distintas especies, inclusive en humanos (Raffan y Kling, 2000). Los receptores A₂ parecen no participar en el preconditionamiento.

La adenosina (Heurteaux y col., 1995; Shang y Cheng, 2000):

- Reduce la probabilidad de apertura del canal regulado por el receptor NMDA.
- Inhibe el influjo de calcio y el eflujo de sodio.
- Activa el canal de potasio sensible a ATP permitiendo la hiperpolarización de la membrana neuronal.
- Deprime la liberación del transmisor neuronal glutamato.
- Bloquea la descontrolada despolarización de la membrana.

Sustancias como la noradrenalina, la acetilcolina, la bradiquinina, los opioides, la endotelina y la angiotensina II, también pueden producir protección a través de una PG que ligada al receptor específico, activa la FLC o FLD. Uno de sus productos, el diacilglicerol (DAG) efectúa la translocación y activación de la PKC.

- **Canales de potasio sensibles al ATP.**

Un canal K_{ATP}, es un complejo octamérico de dos distintos tipos de subunidades proteicas: Los canales rectificadores internos de potasio (Kir) y los receptores de sulfonilurea (SUR). Originalmente se identificaron en el músculo cardíaco. luego se observaron en células α y β del páncreas, músculo liso, músculo esquelético y cerebro (Ashcroft y Gribble, 2000; Cohen y col., 2000), particularmente en hipocampo y han sido asociados con el control de liberación de neurotransmisor (Heurteaux y col., 1995).

Los canales K_{ATP} son normalmente activados cuando la concentración intracelular de ATP disminuye y la concentración de difosfato de adenosina (ADP) aumenta. Sin embargo estos canales pueden ser también directamente activados por una variedad de hormonas y neurotransmisores, por la interacción con PG, o del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y la proteína cinasa A (PKA). Probablemente durante la primera isquemia corta, el sistema de PG libera adenosina, activando receptores tipo A_1 de adenosina y la subsiguiente apertura de canales K_{ATP} de la membrana plasmática, los cuales permiten una protección extensiva contra los efectos deteriorantes de una segunda isquemia más larga. En adición a la adenosina, otros neurotransmisores o péptidos podrían también ser liberados y activar los canales K_{ATP} ; y por lo tanto de un efecto de protección (Heurteaux y col., 1995). En su momento la PKC permite la apertura tardía de los canales K_{ATP} mediante una cascada que incluye la activación de la TK, MAPK, y la NOS por lo tanto también se ha sugerido el papel del NO en la activación de los canales K_{ATP} (Pagliaro y col., 2000).

La apertura del canal K_{ATP} puede hiperpolarizar la membrana neuronal, disminuir la liberación de glutamato, retrasar la muerte neuronal y aumentar el rango de sobrevivencia neuronal. La adenosina y los canales K_{ATP} están involucrados en el preconditionamiento isquémico *in vivo* e *in vitro* pero aún hace falta evidencia directa. El canal K_{ATP} y la adenosina participan en etapas tempranas de isquemia cerebral. (Shang y Cheng, 2000). Los canales K_{ATP} son un blanco molecular de los abridores de canales K_{ATP} (cromakalima, pinacidil, diazoxide, nicorandil, aprikalima, bimakalima) (Ashcroft y Gribble, 2000; Lauritzen y col., 1997). Los canales de K_{ATP} son importantes mediadores de la evolución y efectividad del preconditionamiento isquémico (Heurteaux y col., 1995).

- **Especies reactivas de oxígeno.**

Mientras que la falta energética, la toxicidad por glutamato/calcio, la acidosis y la despolarización pre-infarto contribuyen a la iniciación del daño, la inflamación post-isquémica y la apoptosis participan en la extensión del daño que ocurre en el periodo post-isquémico, por otro lado las especies reactivas de oxígeno (ROS),

radicales libres de oxígeno u oxidantes incluyendo el mensajero neuronal NO (Iadecola, 1999), han sido implicados en la patogénesis de muchos desórdenes neurológicos y disfunciones cerebrales incluyendo la isquemia (Escott y col., 1998; Chan, 1999; Pong, 2004). Las diferentes isoformas de sintasas de óxido nítrico (NOS) son: Regulada por calcio-calmodulina en neuronas (nNOS), iNOS encontrado en la microglia y endotelial (eNOS). Dependiendo de su fuente, el NO juega un doble papel en el cerebro bajo condiciones isquémicas, puede ser tóxico o protector (Dawn y Bolli, 2002; Xuan y col., 1999; Sweeney y col., 1995). El NO a partir de iNOS y nNOS; permiten la neurotoxicidad; sin embargo, la producción de NO desde la eNOS, protege el tejido cerebral por el mantenimiento del flujo cerebral regional (Samdani y col., 1997; Escott y col., 1998).

Inicialmente las ROS son producidas por el metabolismo del ácido araquidónico y la activación de nNOS. En las etapas intermedia y tardía de la isquemia cerebral las especies reactivas de oxígeno son generadas por la infiltración de neutrófilos. En la etapa final las ROS son producidas por iNOS y la ciclo oxigenasa-2 (COX-2) (Iadecola, 1999).

Varias especies de radicales libres de oxígeno, que incluyen el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), perhidroxilo (HO_2^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) se forman siguiendo la reducción inicial de oxígeno. Los $\cdot OH$ son oxidantes extremadamente activos. Estos radicales inician la peroxidación lipídica y ocasionan la oxidación de proteínas y el daño del DNA en las células. Por otro lado, $O_2^{\cdot-}$ son mucho menos reactivos, pero tienen una vida media más larga y pueden formar $\cdot OH$ a través de la reacción de Haber-Weiss:



Otra vía para formar $\cdot OH$ es a través de la reacción de $O_2^{\cdot-}$ y NO, un gas radical que es constantemente producido en el SNC por la nNOS, eNOS e iNOS (Chan, 1999; Sweeney y col., 1995) El producto de esta reacción es el peroxinitrito ($ONOO^-$) (White y col., 2000), que luego activa a la isoforma ϵ de la PKC, disparando una cascada de señales que incluye TK, MAPK, NF- κ B para la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta inmune e

inflamatoria, produciendo un aumento en la síntesis de HSPs que ejercen una acción protectora sobre el tejido mediante distintos mecanismos como: inhibición del influjo de Ca^{2+} , reducción del consumo de oxígeno tisular y abertura de los canales K_{ATP} (Dawn y Bolli, 2002; Xuan y col., 1999). La cascada termina con la activación de iNOS, hasta entonces la producción temprana de NO por eNOS contribuye a la primera ventana de protección y permite la activación de iNOS responsable de la segunda ventana, a través de producción tardía de NO (Pagliaro y col., 2000).

Existe un posible efecto benéfico por parte de las ROS en la primera y segunda ventana de protección. La liberación de NO en la primera ventana de protección ha sido principalmente atribuida a la actividad de la bradiquinina sobre los receptores B_2 endoteliales. La bradiquinina es producida por la acción de la quininocinasa activada por la acidosis que ocurre en la pared vascular durante PI. También es liberado después de la estimulación de las células endoteliales por la adenosina. Contribuye a la protección no sólo por la activación de PKC y los canales K_{ATP} , sino también por el daño de la adhesión de neutrófilos al endotelio, de esta manera previene el daño por los radicales libres de oxígeno.

Estudios recientes han sugerido que la etapa redox del NO puede determinar su papel como protector neuronal o mediador del daño que sigue a la activación de los receptores NMDA. Varias enzimas incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión catalasa; son antioxidantes endógenos que tienen propiedades de limpiadores de radicales libres específicos. SOD en particular ha sido utilizada para reducir el daño cerebral por isquemia asociado al radical superóxido (Chan, 1999).

- **Proteína cinasa C.**

Como en un esquema cualquiera, que requiere la convergencia de todas las vías independientes a una vía final común, en la cascada de neuroprotección la PKC parece ocupar este sitio, debido a que la protección con bradiquinina, adenosina, opioides y radicales libres pueden ser bloqueadas por inhibidores de PKC (Cohen y col., 2000). La PKC es una familia de al menos 12 cinasas de serina/treonina.

Las isoenzimas de PKC pueden ser de tres categorías: convencional que requiere calcio, diacilglicerol y fosfolípido para su activación; original y atípica que no requieren de calcio para su activación (Mochly-Ronsen y Gordon, 1998). Hasta la inducción del segundo periodo de isquemia, la PKC podría reactivarse rápidamente para proteger la célula lo que explicaría el porqué la adenosina y/o los otros receptores deben ser recuperados al instalarse la segunda isquemia. Consecuentemente mientras la PKC permanezca translocada, el corazón estará en un estado de preconditionamiento. Sólo cuando la enzima se revierte al citosol, la protección se pierde (Liu y col., 1994). La FLC y FLD han demostrado ser parte importante de la cascada de señalización de PI y son parte responsable de la activación de PKC en este fenómeno. Las MAPK son enzimas que pueden activarse por TK y PKC involucrándose en la cascada de señalización, que conduce a la protección contra el daño isquémico (Cohen y col., 2000).

Desde que fuera descrito por primera vez, el preconditionamiento isquémico ha sido intensamente estudiado para determinar las condiciones necesarias para su desarrollo, obteniendo considerables avances respecto a la identificación de los mecanismos involucrados, pero aún es necesario conocer mayores detalles respecto de los eventos citoprotectores antes de desarrollar él o los fármacos capaces de mimetizar los efectos dañinos de las isquemias subletales del preconditionamiento y hacer posible la extrapolación clínica del fenómeno; así pues el avance en la investigación debería ser el de aquellas moléculas o vías que son comunes a muchos o todos estos daños, o concentrarse sobre los mecanismos que pueden ser fundamentales para la supervivencia celular (Sharp y col., 2004). Consiguientemente el preconditionamiento en general (Heurteaux y col., 1995 ; Sweeney y col., 1995 ; Iadecola, 1999):

- Se desarrolla en todas las especies animales en las que ha sido estudiado.
- No es específico del cerebro, también ocurre en tejido cardíaco, músculo esquelético, intestino delgado entre otros.
- Son responsables de su desarrollo metabolitos disparadores, mediadores y efectores finales.
- La protección que brinda no guarda relación alguna con la presencia y la

extensión del flujo colateral.

- Sus efectos son transitorios aún cuando se extienden más allá de las 2 o 4 horas en el preconditionamiento temprano y hasta 72 horas en el tardío.
- La hiperglicemia, hipoglicemia, hipotermia, antagonistas de receptores de glutamato, NMDA y Ca^{2+} pueden disminuir el daño.

La reperusión es esencial, aunque no el único requisito para el rescate de las neuronas. Para recuperar las neuronas se debe (Sweeney y col., 1995; Nathal y col., 1993):

- Mantener los niveles de ATP, lo cuál requiere la reperusión temprana de la penumbra y la prevención de la extensión de las ondas de despolarización.
- Evitar la excitotoxicidad del glutamato, mediante el bloqueo de la activación del receptor a glutamato.
- No ser sometidas a sobrecarga citosólica de Ca^{2+} , para ello, los niveles de ATP no deben de descender y los receptores de glutamato no deben ser activados.
- Aumentar la actividad de los neurotransmisores inhibitorios (GABA, adenosina).
- Prevenir la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno.
- Inhibir la actividad de la PKC.
- Mantener los potenciales de membrana.

2.4 Corpus Striatum.

En el siglo XVII y XVIII, el término *corpus striatum* se utilizó para denominar a muchos elementos profundos infracorticales del hemisferio del cerebro. A mediados del siglo XX, la nomenclatura se simplificó proponiendo el término *striatum* para todos los elementos que presentaban morfología estriada y algunos propusieron el uso del término *neostriatum* tras hacer estudios morfológicos comparativos entre diferentes especies (Bentivoglio, 1996).

El *striatum*, es la parte primaria del sistema de ganglios basales del cerebro. Recibe señales de la corteza cerebral; en primates, incluyendo a los humanos, está dividido por un tracto de sustancia blanca llamado la cápsula interna, separándolo en dos sectores llamados el núcleo caudado y el núcleo lenticular (Bentivoglio, 1998).

2.4.1 Núcleo Caudado.

El núcleo caudado, se encuentra cerca del centro del cerebro; en particular, se situado próximo a la línea media. Tiene forma de C con tres porciones: la cabeza en contacto con la pared de los ventrículos laterales, el cuerpo y la cola. Su estrecha relación funcional con otro de los núcleos basales, el putamen, da lugar a su agrupación en el conjunto denominado estriado que también agrupa al núcleo accumbens. Caudado y putamen se encuentran separados por las fibras descendentes de la cápsula interna (Yeterian y Pandya, 1995).

Inicialmente se pensaba que el núcleo caudado principalmente participaba en el control del movimiento voluntario (Kinnier Wilson, 1914). Más recientemente, se ha demostrado que el núcleo caudado está altamente involucrado en el aprendizaje y la memoria (Graybiel, 2005), en particular en materia de tratamiento de retroalimentación (Packard y Knowlton, 2002).

2.4.2 Núcleo Lenticular

El núcleo lenticular, llamado también núcleo extraventricular del cuerpo estriado, está situado debajo y algo por fuera del núcleo caudado, en pleno centro oval. Mide cinco centímetros de longitud. Visto en un corte frontal tiene una forma

señaladamente triangular. Podemos, pues, considerarlo como un prisma triangular y distinguirle tres caras (inferior, interna y externa), dos extremidades (anterior y posterior) y tres bordes. La cara inferior descansa, en su mayor parte, sobre el centro oval del lóbulo temporo-occipital. Es cruzada oblicuamente por la comisura blanca anterior, que le labra un canal en dicha cara, llamado canal de la comisura blanca. La cara superior externa, está cubierta también por una segunda lámina blanca, la cápsula externa, que separa el núcleo lenticular del antemuro y de la ínsula de Reil. La extremidad posterior se adelgaza y se resuelve en cierto número de prolongaciones longitudinales, regularmente superpuestas en sentido vertical. La extremidad anterior es más voluminosa, irregularmente redondeada, y se fusiona gradualmente con la cabeza del núcleo caudado, de modo que los dos núcleos así reunidos forman en conjunto una especie de 'U' tendida, cuyas dos ramas están representadas por los dos núcleos y la parte media por la masa gris que los une por su extremidad anterior. De los tres bordes, uno es superior, el segundo inferior y el tercero interno; este último sumamente convexo hacia dentro (Latarjet, 2004).

El núcleo lenticular, visto en un corte frontal, presenta una masa gris fundamental, atravesada de abajo arriba por dos láminas blancas, una interna (lámina medular interna) y otra externa (lámina medular externa). Estas dos láminas medulares descomponen la masa gris en tres segmentos distintos: segmento externo o putamen (que es de color más intenso), segmento interno (que es de menor coloración) y segmento medio. El segmento medio y el interno han recibido también, en conjunto, el nombre de *globus pallidus*.

El putamen parece desempeñar un importante papel en el condicionamiento operante (aprendizaje a través de refuerzo). Las cortezas somatosensorial y motora, el núcleo intralaminar del tálamo y la sustancia negra proyectan al putamen y éste, a su vez, proyecta en áreas motoras y premotoras del córtex a través del *globus pallidus* y tálamo (Latarjet, 2004).

2.4.3 Tipos celulares.

El *striatum* es heterogéneo en términos de neuronas. Componiéndose de los siguientes tipos de neuronas (Yelnick y col., 1997):

- Neuronas medianas espinosas: Llamadas así por la presencia de espinas en las dendritas, componiendo 96% del *striatum*.
- Neuronas de Deiter: Componen 2%, con ramificaciones grandes y poco separadas que se observan como neuronas palidonigras.
- Interneuronas colinérgicas: Componen 1%, son tónicamente activas y morfológicamente diferentes de aquellas observadas en roedores. Se desactivan en respuesta a eventos conductuales.
- Neuronas GABAérgicas: Componen el 1% restante, regulando diferentes funciones motoras siendo estimuladas por rutas dopaminérgicas.

2.4.4 Inervaciones.

• Aferentes.

Las conexiones aferentes más importantes en términos de cantidad de axones es la conexión corticostriatal. Muchas partes de la neocorteza inervan el *striatum* dorsal. Las neuronas piramidales están localizadas en capas, terminando en los cuerpos de las neuronas medianas espinosas. Estas son rutas glutaminérgicas, excitan neuronas estriatales. Otra conexión aferente es la nigrostriatal, que surge de las neuronas de la sustancia *nigra pars compacta*, los axones de éstas hacen contacto con las elongaciones de las neuronas medianas espinosas y son de naturaleza glutaminérgica también. El *striatum* también recibe conexiones aferentes de otros elementos de los ganglios basales tales como el núcleo subtalámico con función glutaminérgica o el *globus pallidus* que es GABAérgico (Rosell y col., 1999).

• Eferentes.

El *striatum* asimismo, proyecta señales a los demás ganglios basales a través del haz palidonigral, que es un haz muy denso de axones escasamente mielinados, lo que le da una apariencia blanquecina. Esta conexión comprende el

globus pallidus externo, interno, la sustancia nigra compacta y reticulada. Las neuronas de esta proyección se inhiben por sinapsis GABAérgicas del *striatum* dorsal. Entre estas terminales, el *globus pallidus* externo no envía axones hacia fuera del sistema. Otros envían axones al colículo superior. Otros dos haces comprenden la salida al tálamo, formando dos canales separados: uno a través del segmento interno del *globus pallidus* al núcleo ventral del tálamo, y de allí al área motora suplementaria cortical y también a través de la sustancia nigra al núcleo ventral anterior del tálamo y de allí a la corteza frontal y la corteza oculomotora (Rosell y col., 1999).

2.4.5 Función.

Las neuronas espinosas, así como las terminales de los axones corticales presentan receptores metabotrópicos de dopamina. Las cascadas bioquímicas activadas por la estimulación de estos receptores pueden modular la función pre y post-sináptica, tanto en corto como largo plazo.

El *striatum* es mejor conocido por su papel en la planeación y modulación del las rutas nerviosas del movimiento (Schultz, 1992), pero está también involucrado en una variedad de procesos cognitivos, tales como función ejecutiva (Burke y col., 2010). En los humanos el *striatum* se activa por estímulos asociados con la recompensa, pero también con la aversión o bien con estímulos inesperados o intensos, así como los detalles asociados a dichos eventos. Las neuronas ventrales dopaminérgicas que inervan porciones del *striatum* se han identificado como la sede del sentimiento de recompensa (Schultz, 1997).

2.4.6 Estados patológicos.

La enfermedad de Parkinson da como resultado la pérdida de inervación dopaminérgica en el *striatum* y otros ganglios basales, con sus respectivas consecuencias en el detrimento de la función motora y eventualmente fallas cognitivas. La atrofia del *striatum* está involucrada directamente en discinesias y en el desarrollo de enfermedad de Huntington (Walker, 2007).

En el caso de infarto cerebral, es precisamente el *striatum* la zona del cerebro con mayor riesgo de ser afectada. La irrigación de esta zona proviene de

vasos ramificados de la arteria media cerebral, que pasa lateralmente justo por debajo del lóbulo frontal, tomando finalmente una posición entre los lóbulos temporal y frontal en la fisura de Silvio. La parte inicial de la arteria media cerebral es un vaso sanguíneo llamado segmento M1. Mientras pasa lateralmente, se ramifica en una serie de seis a doce arterias muy delgadas llamadas lenticuloestriales que viajan directamente hacia arriba para irrigar los ganglios basales y gran parte de la cápsula interna (Stardring, 2008).

Dado que las arterias lenticuloestriales se ramifican directamente de una arteria principal con presión sanguínea muy alta, éstas pequeñas arterias tienen un riesgo significativo de sufrir daño por hipertensión, lo que causaría su ruptura, produciendo un infarto cerebral del tipo hemorrágico con centro en esa zona. O bien pueden ocluirse por algún trombo, produciendo un infarto cerebral trombótico (Gorelick y col., 2008).

Esto es de trascendental importancia en caso de infarto cerebral, puesto que estos vasos son terminales y las regiones a las que irrigan no poseen irrigaciones alternativas. Por estas razones, la interrupción del flujo sanguíneo en ellas da lugar a la aparición de síntomas clásicos de infarto cerebral.

Un infarto localizado en el putamen o en el cuerpo caudado puede involucrar a estructuras vecinas como la cápsula interna y otras zonas más distantes de sustancia blanca del hemisferio, o bien puede afectar el sistema ventricular (Schmidh-Kastner y col., 1997). Los infartos pueden tener consecuencias funcionales severas si involucran a fibras motoras o sensoriales en la cápsula interna y consecuentemente a la *substancia nigra* generando síntomas similares a la enfermedad de Parkinson (Nakane y col., 1992), así como disfunciones cognitivas que van de leves a severas; en el mejor de los casos, las consecuencias pueden ser menores si el infarto únicamente afecta a regiones pequeñas de materia blanca que interconecta los ganglios basales, dado que el cerebro compensa estas afectaciones creando nuevos axones (Tanaka y col., 2004).

2.5 SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO.

2.5.1 Generalidades.

Las sintasas de óxido nítrico (NOS), son enzimas diméricas que realizan la catálisis de la reacción de L-arginina, NADPH y oxígeno para producir L-citrulina y óxido nítrico (Knowles y Moncada, 1994). Se han identificado tres isoformas de la NOS presentando diferente propiedad catalítica y sensibilidad a inhibidores (Nathan, 1994). Estas isoformas son:

- nNOS o NOS-1, presente en tejido neuronal.
- iNOS o NOS-2, inducible en procesos inflamatorios o traumatismos.
- eNOS o NOS-3, presente en células endoteliales del tejido vascular liso.

De estas isoformas, la nNOS y la eNOS son isoformas constitutivas, encontrándose presentes en el cuerpo jugando un papel importante en los procesos fisiológicos, en tanto que la iNOS no se encuentra presente de manera normal, sino que su expresión y actividad está mediada a través de la aparición de procesos inflamatorios o traumáticos (Marletta, 1994).

Existen tres genes distintos que codifican la expresión de las diferentes isoformas (Janssens y col., 1992; Marsden et al., 1992), todas ellas son enzimas proteicas que presentan dos dominios bien definidos. En el área amino terminal tienen un dominio oxigenasa que presenta sitios de unión para un grupo hemo, tetrahydrobiopterina (BH₄) y L-arginina, unido por un sitio de unión para el complejo calcio-calmodulina (CaM); por su parte el dominio reductasa en el carbono terminal contiene sitios de unión para FAD, FMN y NADPH (McMillan y Masters, 1995), como puede observarse en la Figura 11.

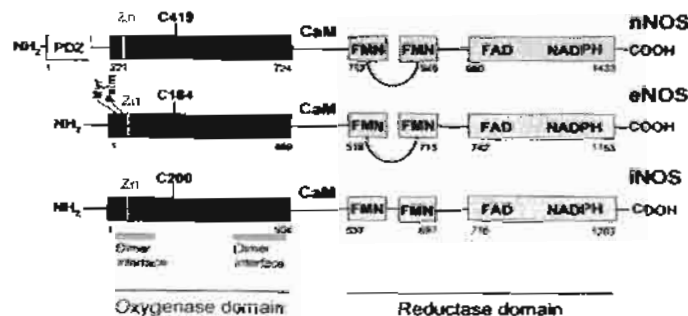


Figura 11. Estructura de las diferentes isoformas de sintasa de óxido nítrico.

Los dominios por si solos son catalíticamente activos, sin embargo, se requiere la combinación de ambos para realizar la síntesis completa de NO (Sheta y col., 1994; Chen et al., 1996; Ghosh y col., 1995), la reacción se muestra en la Figura 12.

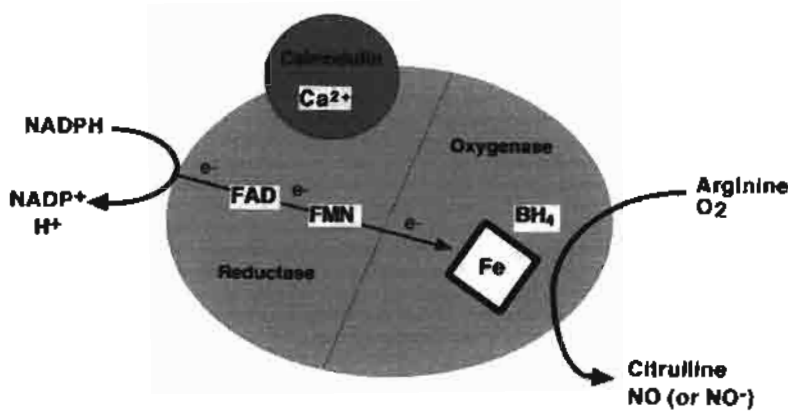


Figura 12. Reacción y cofactores de la sintasa de óxido nítrico.

En esta reacción, los electrones son donados por el NADPH al dominio reductasa de la enzima y proceden a través de los acarreadores redox FAD y FMN al dominio oxigenasa donde interactúan con el hierro contenido en el grupo Hemo y BH₄ en el sitio activo, para catalizar la reacción de oxígeno con L-arginina generando L-citrulina y NO como productos. Para que la enzima se encuentre en forma activa es necesaria la unión del complejo CaM a la enzima (Stuehr y col., 1991; Schmidt y col., 1996; Hobbs y col., 1994).

Las sintasas de óxido nítrico, sufren una dimerización en la que 2 moléculas de NOS se unen para realizar su función catalítica. La formación de estos dímeros involucra dos secciones de la estructura primaria de la enzima, principalmente el sitio de unión para BH₄ y un dominio de "gancho" amino terminal que se intercala entre los dos monómeros al formar el dímero para estabilizarlo (Crane y col., 1998; Fischmann y col., 1999). Esto es principalmente crítico en la dimerización de la iNOS ya que es totalmente dependiente de la presencia de BH₄, a diferencia de la nNOS y eNOS, que pueden dimerizarse aún libres de BH₄ conservando actividad catalítica (Klatt y col., 1995).

Las sintasas de óxido nítrico constitutivas forman parte de un delicado sistema regulatorio para mantener la homeostasis vascular, así como parte del control de la conducción de impulsos nerviosos por tanto existen diversos mecanismos bioquímicos que controlan la actividad de estas sintasas, así como su expresión.

En las sintasas constitutivas, el principal mecanismo de control de actividad está dado por la presencia de CaM, cuya unión a las sintasas constitutivas es necesario para activar la función catalítica (Abu-Soud., y col., 1994); es precisamente por este hecho que a las sintasas constitutivas se les conoce como sintasas dependientes de CaM (Salerno y col., 1997), a diferencia de la iNOS, que se une de manera notablemente fuerte al complejo CaM presentando una actividad catalítica constante, sin requerir de un influjo de este complejo (Salerno y col., 1997; Nishida y col., 1999; Daff y col., 1999).

Otro mecanismo de regulación de actividad de las sintasas de óxido nítrico es una retroalimentación dada por la misma producción de óxido nítrico. Es de mencionarse la estabilidad de complejos de Fe^{2+} -NO, y cualquier enzima que forme un intermediario de hierro reducido asociado a un grupo hemo, tiene potencial para ser inhibido por óxido nítrico (Cooper, 1999). En las sintasas constitutivas, el Fe^{3+} del grupo hemo del dominio oxigenasa de la sintasa, puede ser reducido y formar complejos estables con iones nitrosilo (NO^-) sintetizados como un producto imperfecto de la actividad normal de la enzima, o de la reducción del óxido nítrico por condiciones del entorno (Abu-Soud y col., 1996), sin embargo, la iNOS presenta una inhibición muy débil a través de este mecanismo, no siendo así la nNOS que puede llegar a encontrarse hasta en un 95% en complejo nitrosilado, en menor grado se presenta este mismo mecanismo en la eNOS (Santolini y col., 2001).

2.5.2 Sintasa inducible de óxido nítrico.

Como ya se mencionó previamente, el NO se sintetiza conforme se requiere por períodos cortos de tiempo (segundos a minutos) posterior a la activación enzimática de las sintasas constitutivas (eNOS y nNOS). En contraste con ellas, la

iNOS se expresa únicamente después de la activación celular por factores inflamatorios producidos durante una lesión o por la liberación de radicales libres durante situaciones de estrés oxidativo (Forstermann y col., 1998). La producción de NO por parte de la iNOS se realiza por períodos de tiempo comparativamente largos (horas a días). Por consiguiente, la síntesis regulada en pulsos cortos contra una producción constante dicta la diferencia entre las acciones fisiológicas y patofisiológicas del NO (Geller y Billiar, 1998).

Los factores inflamatorios más comunes que incrementan la transcripción de la iNOS son el INF- γ , LPS, IL-1 β y el TNF α ; cada uno de estos factores ejerce su inducción por mecanismos distintos mediados por diferentes receptores.

El INF- γ ejerce su acción al unirse a su receptor específico, lo cual ocasiona un cambio conformacional en la estructura del receptor, ocasionando una dimerización y autofosforilación de las cinasas Janus (JAK1 y JAK2), las cuales a su vez fosforilan las proteínas de transducción de señal y transcripción (STAT) que se translocan al núcleo y allí activan la expresión del factor de regulación de interferón (IRF-1) que en turno, incrementa la transcripción de la iNOS (Singh y col., 1996).

El IL-1 β aumenta la transcripción de la iNOS por dos mecanismos distintos; el primer mecanismo consiste que el IL-1 β al unirse a su receptor específico, el cambio conformacional activa las proteínas cinasas que en turno fosforilan las proteínas C/EBP β las cuales son factores de transcripción que actúan en dominios CCAAT (citidina-citidina-adenosina-adenosina-timidina) presentes en promotores de genes, iniciando la transcripción de los mismos (Ramji y Foka, 2002), en este caso el gen que transcribe a la iNOS. El otro mecanismo por el cual la IL-1 β activa la transcripción de la iNOS se realiza mediante la activación de la proteína TRAF-6, que es un transductor de señal bioquímica, resultando en la fosforilación de las cinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAK), ésta activa el NIK, que es una proteína cinasa de serina-treonina que en turno ocasiona la fosforilación de la cinasa IKK $\alpha\beta$ que ocasiona la activación del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$), el cual

activa la transcripción de genes que finalmente incrementa la expresión de la iNOS (Singh y col., 1996).

El LPS comparte el mecanismo de activación de la transcripción de la iNOS con la IL-1 β , solo que la activación de la IRAK, se realiza a través de la interacción del receptor para LPS (receptor TOLL), con las proteínas que interactúan con estos receptores (TOLLIP), que mediante la mediación de la proteína MyDSS activa el IRAK y de aquí se sigue el mismo mecanismo que en la IL-1 β (Boyle y col., 2000).

Por su parte el TNF α , también realiza su acción a través de una activación de la NIK, sin embargo, el receptor de TNF α , transduce la señal a través de la activación de la proteína FADD, que es activada por la dimerización de 2 proteínas asociadas al receptor, que son TRADD y RIP. El FADD fosforila el TRAF-6, que puede directamente fosforilar el NIK, resultando en la activación del NF κ B y por consiguiente el incremento de la transcripción de la iNOS (Kan, Xie y Finkel, 1999).

En la Figura 13 puede observarse un esquema resumido de los diversos procesos que incrementan la transcripción de la iNOS.

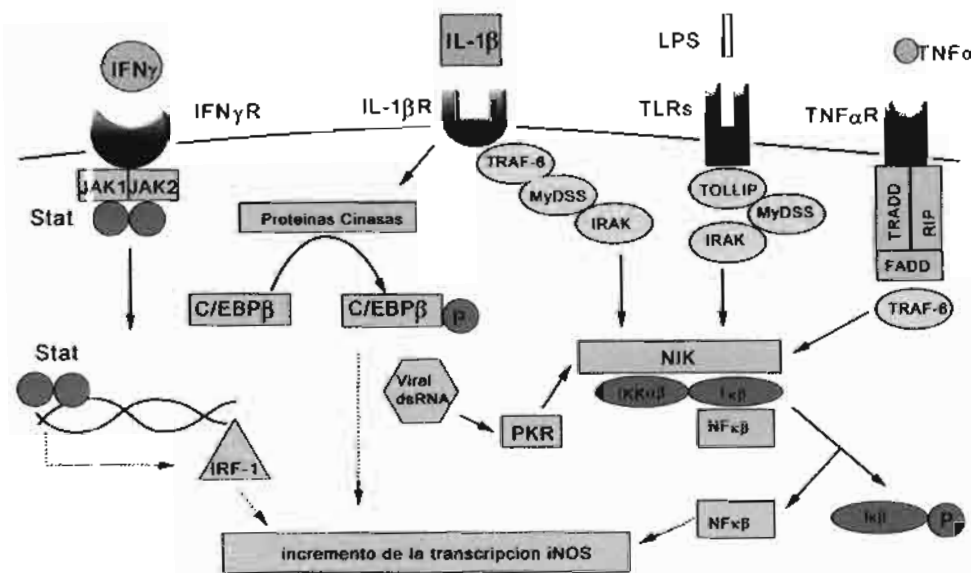


Figura 13. Mecanismo del incremento de la transcripción de la iNOS por acción de factores de inflamación.

El DNA que codifica la iNOS se ha clonado a partir de diferentes tejidos de distintas especies, encontrándose con muy pequeñas diferencias en la secuencia de nucleótidos codificada. La identidad promedio entre la secuencia aminoácida del iNOS humano y murino es de aproximadamente 80%, y ésta se ha mostrado homogénea en diferentes especies estudiadas (rata, conejo, etc.). La alta homogeneidad en las isoformas de la iNOS entre diferentes especies y varios tipos celulares sugiere que son todas productos del mismo gen. Sin embargo, la transcripción humana de la iNOS en células específicas parece estar regulada de manera diferente, lo que puede observarse en estudios que han encontrado que en ratones hay una mayor inducción en presencia de LPS e INF- γ , mientras que en humanos ésta respuesta es baja; se observa sin embargo lo opuesto, en lo referente a la IL-1 β y al TNF α (Eissa y col., 1996).

Inhibidores de las NOS

Hay una cantidad considerable de inhibidores de las NOS descritos en la literatura, y se usan continuamente como herramientas farmacológicas, presentando diferentes niveles de selectividad por las diferentes NOS así como diversos mecanismos de acción. La mayoría de los inhibidores de las NOS que se han identificado principalmente son análogos del sustrato L-arginina con la cual compiten por los sitios de unión a la enzima (Bryk y Wolff, 1999). En esta categoría tenemos los compuestos en la Figura 14:

Debido a que estos compuestos compiten por un sustrato común a las tres isoformas, encontramos que hay grandes problemas significativos para encontrar inhibidores con mayor selectividad. Mucha investigación se ha hecho para encontrar inhibidores selectivos, así como para describir el mecanismo de inhibición, en especial de la iNOS por la aminoguanidina (Misko y col., 1993; Wolff y Lubeskie, 1995;), N⁵-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (McCall y col., 1991) y N⁶-iminoetil-L-lisina (L-NIL) (Wolff y col., 1998), GW273629 (S-[2-[(1-iminoetil)-amino]etil]-4, 4-dioxo-L-cisteína) y GW274150 (S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-L-homocisteína) (Alderton y col., 2000).

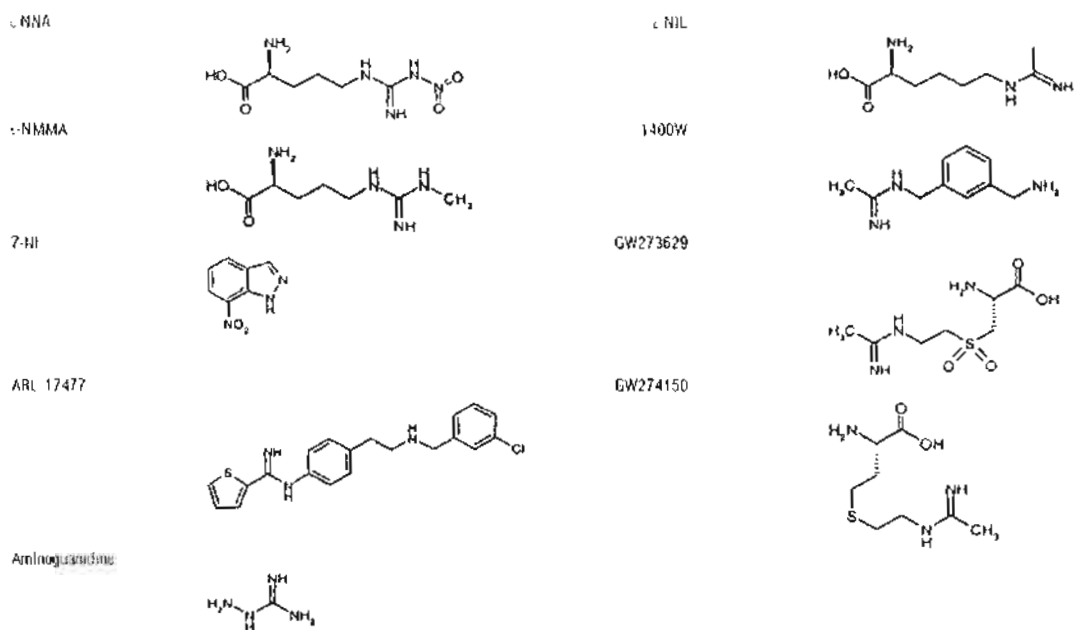


Figura 14. Estructuras de diferentes inhibidores de las NOS que actúan en el sitio de unión para L-arginina.

Estos últimos requieren enzima activa y NADPH para poder tener efecto, en principio se unen débilmente a la enzima para formar un complejo de enzima-inhibidor; posteriormente este complejo se modifica ya sea por cambio conformacional de la enzima o del inhibidor, dando lugar a la formación de enlaces covalentes, lo que ocasiona una fuerte inhibición (Bryk y Wolff, 1999).

Existen otros inhibidores actualmente en desarrollo que actúan a nivel del sitio de unión de la BH_4 principalmente análogos pterínicos tales como 4-amino- BH_4 , BH_2 y otros análogos sintéticos, sin embargo su utilización está limitado prácticamente a investigación farmacológica sin aplicación clínica ya que tienden a interactuar inespecíficamente en otros procesos que utilizan a la BH_4 como sustrato (Werner y col., 1996; Bommel y col., 1998; . El mismo problema se puede encontrar con inhibidores que alteran la conformación del grupo Hemo y que compiten con el complejo CaM (Wolff y col., 1993).

2.5.4 Aminoguanidina.

En estudios de laboratorio se encontró que la aminoguanidina es un inhibidor selectivo para la sintasa inducible del oxido nítrico teniendo una selectividad 100 veces mayor sobre las sintasas constitutivas (Corman y col., 1998).

Asimismo en Europa y Estados Unidos de América, se ha promovido el uso de la aminoguanidina como suplemento dietético con actividad antioxidante para retrasar efectos de envejecimiento; diversos estudios han encontrado que la aminoguanidina presenta actividad para prevenir la formación de productos de glicosilación avanzada, que se forman debido al proceso de envejecimiento y a padecimientos como Diabetes Mellitus (Zimmerman y col., 1995; Makita y col., 1995; Cameron y Cotter, 1996).

El uso de la aminoguanidina como agente neuroprotector no ha sido investigado ampliamente. Dadas las características de inhibición de las NOS que presenta, en especial su selectividad por la iNOS, así como los reportes de baja toxicidad al ser utilizada como parte de suplementos nutricionales, este inhibidor se eligió como fármaco principal para este trabajo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad vascular cerebral es un padecimiento que anualmente afecta a un gran número de personas en nuestro país, de las cuales aproximadamente el 20% fallecen. Los pacientes con diabetes mellitus, presentan notables alteraciones fisiológicas ocasionadas por la hiperglicemia en el sistema vascular, que los hace presentar un riesgo mucho mayor que el resto de la población para padecer de enfermedad vascular cerebral. Los pacientes que sobreviven padecen severos problemas secundarios o secuelas los cuales suponen un costo anual por persona entre 60,000 a 80,000 dólares.

Uno de los mecanismos que ocasiona el severo daño al cerebro durante la enfermedad vascular cerebral, es el causado por sobreproducción de óxido nítrico y el subsecuente estrés oxidativo en procesos de isquemia-reperfusión. En este caso, el exceso de NO producido por la iNOS interactúa con especies reactivas de oxígeno como radicales superóxido produciendo peroxinitrito que en consecuencia ocasiona un incremento en la lesión al tejido.

La importancia de encontrar procedimientos para prevenir y corregir las consecuencias de la producción incrementada de óxido nítrico es uno de los temas más importantes en la investigación de las alteraciones fisiológicas durante el proceso de isquemia-reperfusión. No se ha establecido de manera muy clara la eficacia de fármacos que puedan tener un efecto neuroprotector en este proceso, con excepción de la dapsona.

El uso de la aminoguanidina como agente neuroprotector durante procesos de isquemia-reperfusión no ha sido investigado ampliamente. Asimismo no se ha probado el efecto combinado con aminoguanidina en modelos experimentales de diabetes, por lo que se hace necesario evaluar los posibles beneficios de esta combinación como una mejora al tratamiento.

4. HIPÓTESIS.

La combinación de aminoguanidina y dapsona presenta un mayor efecto neuroprotector que el uso de un solo fármaco. El incremento en la eficacia se debe a una mayor inhibición de la iNOS con consecuente disminución de la producción de óxido nítrico.

5. OBJETIVOS

5.1 General.

Evaluar la actividad sola y combinada de dapsona y aminoguanidina en modelo *in vitro* de infarto cerebral en *corpus striatum* de rata con diabetes inducida por estreptozotocina. Así como observar cambios en la expresión y actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico.

5.2 Específicos.

- Realizar un estudio comparativo entre dos métodos analíticos, espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución, para la determinación de actividad de la iNOS, con la finalidad de elegir el método más adecuado para los estudios a realizar.
- Determinar la expresión y actividad de la iNOS midiendo y comparando el óxido nítrico producido en rebanadas de cuerpo estriado cerebral de animales diabéticos y no diabéticos, sometidos a proceso de isquemia-reperfusión.
- Evaluar la actividad de la iNOS al tratar los tejidos sometidos a isquemia-reperfusión a diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona para observar el efecto de la administración de los fármacos individualmente.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Modelo animal.

Se utilizó el modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina. Ratas Wistar machos (180-200g); los animales se organizaron en 2 sub-grupos para cada ensayo: diabético (n=6) y no diabético (n=6).

Se administró una inyección de 2 mL de estreptozotocina intraperitonealmente (66 mg/kg) para inducir diabetes no insulino dependiente en el grupo de animales designado como diabético (McNeill, 1999); mientras que al grupo de animales no diabéticos se les administró un placebo consistente en solución de NaCl al 0.9%. Se dejaron pasar 90 días para desarrollar diabetes crónica en los animales tratados con estreptozotocina, al término de los cuales se midió la glucosa en sangre con un glucómetro Bayer Contour TS, se consideraron diabéticos los animales que presentaran concentraciones superiores a 25 mmol/L de glucosa en sangre. Los animales se sacrificaron por decapitación.

Se extrajo el cerebro de los animales haciendo un corte longitudinal dejando descubierto el *corpus striatum*, el cual fue cuidadosamente removido y posteriormente rebanado utilizando el método descrito por McIlwain (McIlwain, 1996). Las rebanadas fueron montadas en tubos de ensayo (4 rebanadas por tubo) conteniendo solución Krebs-Ringer conteniendo NaCl 118 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgSO_4 1.17 mM, Glucosa 5.6 mM y TRIS 25 mM en un baño con temperatura de 37°C, burbujeando 95% O_2 y 5% de CO_2 .

Todos los experimentos fueron desarrollados durante la fase de luz de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y siguiendo las recomendaciones Comité de Ética de para el manejo de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México.

6.2 Modelo experimental de Isquemia-Reperfusión.

Las rebanadas de *corpus striatum*, fueron organizadas en grupos, La mitad fue el grupo control el cual se mantuvo con burbujeo constante de 95% O_2 y 5% CO_2 , mientras que el otro grupo se le realizó el tratamiento isquémico. Del total de

las muestras en los dos grupos, a la mitad no se les asignó tratamiento farmacológico, mientras que a la otra mitad se le adicionó aminoguanidina 250, 500 y 1000 μM o Dapsona 0.6, 1.2, 2.4 y 4.8 μM y sus respectivas combinaciones para observar los efectos en la actividad de la sintasa de óxido nítrico.

Se indujo isquemia al retirar el O_2/CO_2 y exponiendo las muestras a burbujeo con N_2 por 20 minutos, al término de los cuales se reanudó la administración de O_2/CO_2 durante media hora.

Para la cuantificación espectrofotométrica se tomaron muestras de buffer (2mL) en tubos Eppendorf para cuantificar la cantidad de nitritos producidos (Miranda y col., 2001).

Para la determinación por CLAR, fue necesario tratar las muestras en un baño ultrasónico durante diez minutos para romper las membranas celulares de los tejidos y posteriormente desproteinizar las muestras sometiendo el contenido completo de los tubos a centrifugación (14,000 rpm) por veinte minutos a 4°C , ya que el manejo de muestras sin desproteinizar, pueden causar daños en la columna; se tomaron alícuotas de 100 μL del sobrenadante las que fueron inyectadas en el sistema de CLAR para su cuantificación.

6.3 Cuantificación de Nitritos Totales mediante reacción de Griess modificada.

Para cuantificar los nitritos se realizó una determinación espectrofotométrica utilizando la metodología descrita previamente (Miranda y col., 2001). La cual consiste en una modificación de la reacción de Griess (Griess, 1879). Esta reacción permite cuantificar nitritos, pero no nitratos. Por esta razón, la modificación incluye la reducción de los nitratos a nitritos utilizando VCl_3 . La determinación se realizó a temperatura ambiente haciendo una curva de calibración con Nitrito de Sodio, utilizando 7 puntos de concentración (3.125 μM , 6.25 μM , 12.5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y 200 μM).

Para determinar cada punto de la curva se añadió en un tubo Eppendorf 200 μL de solución estándar, 200 μL de solución saturada de VCl_3 , y 100 μL de

soluciones de reactivos de Griess, SULF 2% y NEDD 0.1%. Se siguió la adición de las mismas cantidades de soluciones a cada una de las muestras, y se incubaron todos los tubos en un baño a 37°C por un período de 30 minutos.

Posteriormente se procedió a medir la absorbancia a 540 nm utilizando el medio de disolución como blanco, estableciéndose una regresión lineal para los valores medios de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva de calibración.

Los valores obtenidos por triplicado de cada muestra se compararon con los obtenidos en la recta de regresión obtenida a partir de la curva de calibración.

6.4 Cuantificación de L-Citrulina por CLAR.

Se realizó mediante el método descrito por Carlberg en 1994, utilizando un equipo de CLAR con equipado con una bomba binaria Perkin-Elmer LC-200 con un loop de 20µL, utilizando un detector espectrofotométrico de fluorescencia Beckman, modelo 157; y una columna de fase reversa Sigma-Aldrich SUPELCOSIL LC-18-DB de 250x4.6 mm, con tamaño de partícula de 5µm.

Se ajustaron las longitudes de onda de excitación/emisión del detector a 338/425nm. Se utilizó una fase móvil en flujo isocrático consistente en 11.5% metanol, 11.5% acetonitrilo y 1% tetrahidrofurano en buffer de fosfatos (KH₂PO₄) 10mM ajustado a pH de 5.9 con una velocidad de flujo de 1.5 ml/min.

Para determinar los tiempos de retención se inyectaron estándares de los siguientes aminoácidos L-Aspártico, L-Glutámico, L-Glutamina, L-Glicina, L-Citrulina, L-Arginina y L-Taurina para obtener sus tiempos de retención.

Se verificó la linealidad de este sistema analítico, mediante la realización una curva de calibración en la cual se inyectaron estándares de L-Citrulina a las siguientes concentraciones 3.125 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 mM, 100 µM; una vez realizado esto, se inyectaron las muestras desproteinizadas obtenidas del modelo *in vitro* por triplicado y se cuantificó la cantidad de L-citrulina de las muestras mediante comparación de las áreas obtenidas con la recta de regresión de la curva de calibración.

6.5 Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de la cantidad de óxido nítrico producido en los diversos tejidos se analizaron mediante software computacional SPSS 16.0 y Graphpad Prism 4.0 para Mac. Se utilizó análisis de varianza de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett para determinar diferencias significativas entre los grupos con respecto del control; así como análisis de varianza de doble vía para la evaluación de diferencias en las comparaciones de las combinaciones de fármacos. Tomando un valor de $p < 0.05$ para la significancia estadística.

7. RESULTADOS.

7.1 Evaluación y elección del método analítico.

En experimentos preliminares se realizó la adaptación de la técnica espectrofotométrica en el laboratorio de neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se encontró que la curva de calibración promedio (n=3) para nitritos presentó buena linealidad como puede observarse en la Figura 15.

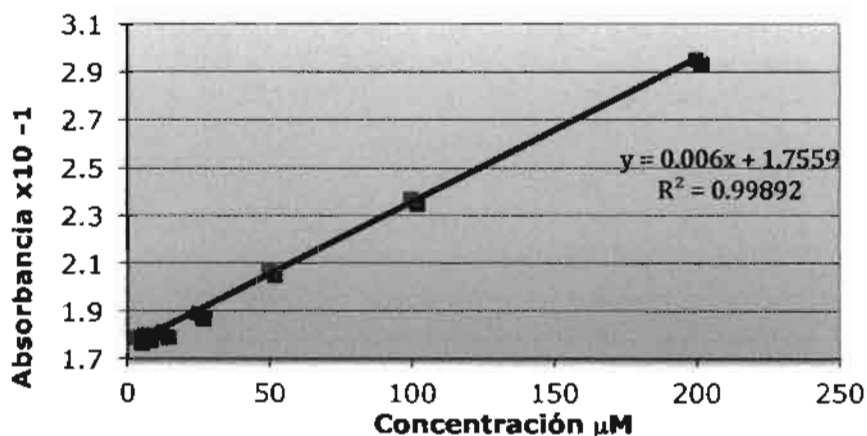


Figura 15. Curva de calibración para determinación de NaNO_2 por espectrofotometría.

Una vez determinada la linealidad del sistema se procedió a hacer mediciones a muestras obtenidas de un grupo preliminar de animales (n=4) obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 16.

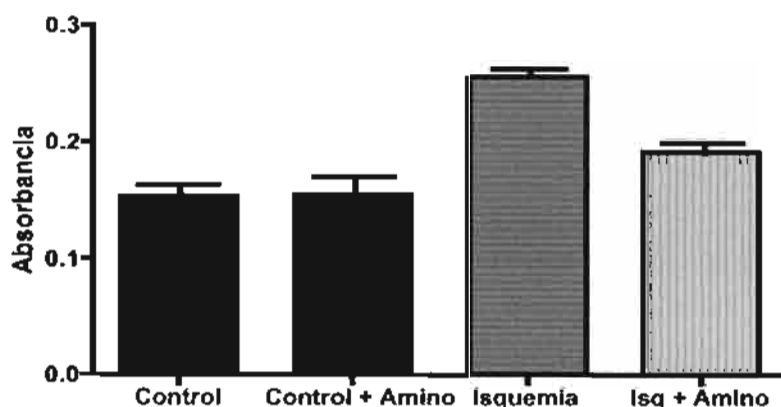


Figura 16. Resultados de la actividad de la iNOS en los diferentes tratamientos. (unidades de absorbancia).

Una vez realizados los experimentos preliminares, se procedió a repetir el mismo procedimiento para posteriormente compararlo con la técnica por CLAR utilizando una mayor cantidad de muestras (n=6). Se encontró que la detección de nitritos, de nuevo se mantuvo lineal en las concentraciones verificadas en la curva de calibración como puede verse en la Figura 17. Una vez habiendo establecido la relación lineal, se obtuvieron los valores de concentración.

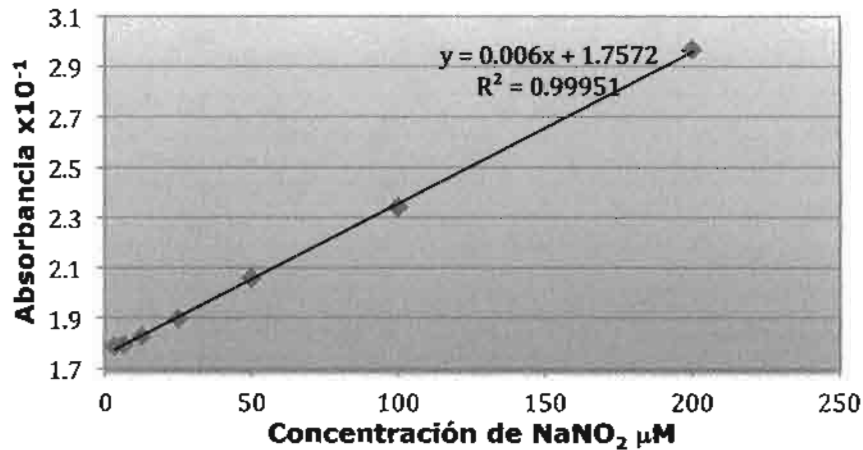


Figura 17. Curva de calibración para NaNO₂ por Espectrofotometría UV/Vis.

Los valores de concentración obtenidos pueden observarse en la Figura 18. Donde puede observarse claramente que los tejidos que sufrieron un proceso isquémico, incrementaron como se esperaba su concentración de nitritos por el aumento en la producción de NO por la iNOS; la inhibición de la enzima por la aminoguanidina redujo significativamente las concentraciones de nitritos.

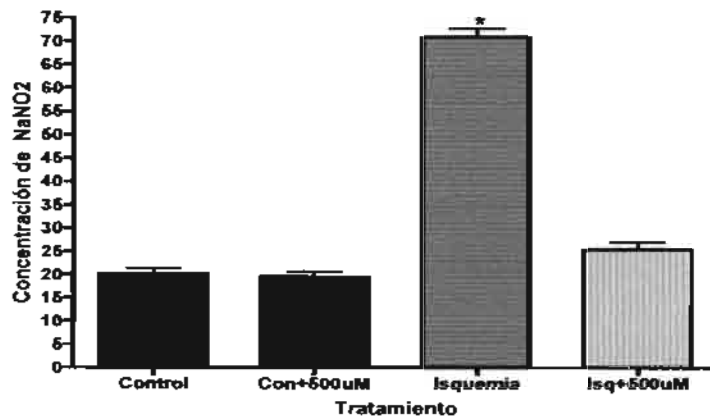


Figura 18. Concentraciones de Nitritos en μM producidos durante los procesos de isquemia y tratamiento con Aminoguanidina medidos por espectrofotometría. (Promedio ± EEM, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. *p<0.05)

Después de haberse obtenido los resultados mediante espectrofotometría UV/Visible, se realizaron las mismas cuantificaciones de NO, mediante el método cromatográfico. Para conocer los tiempos de retención de la L-citrulina, se adicionaron estándares de diversos aminoácidos, obteniéndose un tiempo de retención de 10.098 minutos. La curva de calibración promedio (n=6) también demostró linealidad para este método analítico como se aprecia en la Figura 19.

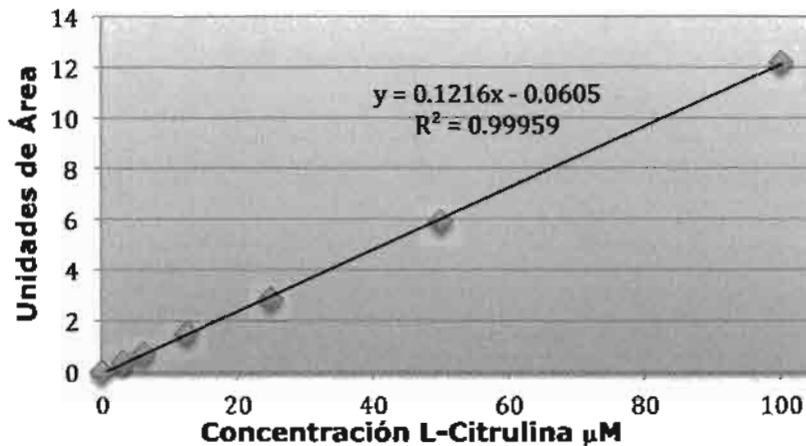


Figura 19. Curva de Calibración para L-Citrulina por CLAR.

Una vez establecida la linealidad, se procedió a correr las muestras tomando en cuenta el tiempo de retención obtenido. Se compararon las áreas obtenidas con los estándares, y se determinó la concentración de L-citrulina en las muestras como se muestra en la Figura 20.

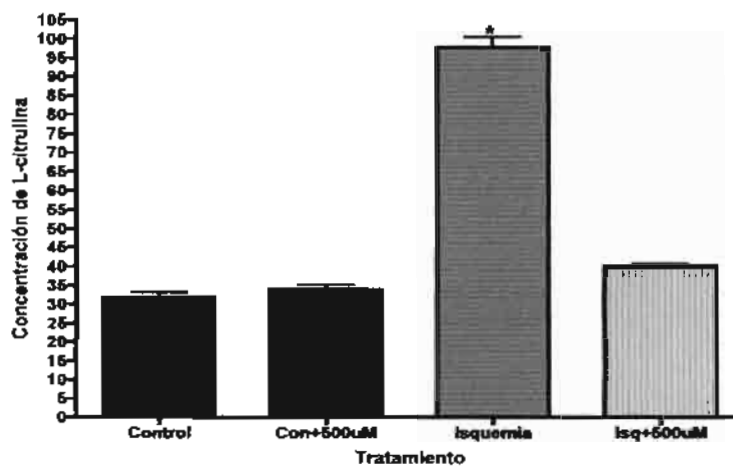


Figura 20. Concentraciones de L-citrulina en μM producidos durante los procesos de isquemia, y con tratamiento con Aminoguanidina medidos por CLAR. (Promedio ± EEM, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. *p<0.05).

Los valores obtenidos por cromatografía concordaron con los encontrados por espectrofotometría como se muestra en la Figura 21.

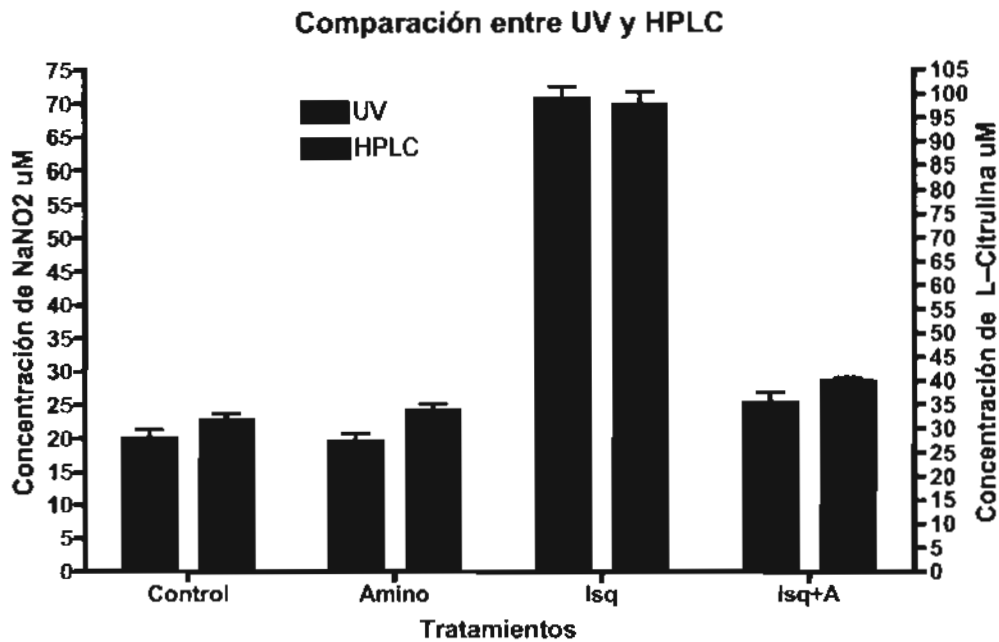


Figura 21. Comparación de los valores obtenidos para ambas técnicas analíticas.

Ambas metodologías presentaron una sensibilidad adecuada para la determinación indirecta de la producción de NO por la iNOS en las concentraciones que se producen en el tejido en investigación. En ambas técnicas tanto el grupo control, como el grupo tratado con aminoguanidina, se mantuvieron en los niveles basales, por lo que se puede concluirse que no hubo inducción de la iNOS en estas condiciones. Al someterse a un proceso isquémico, el grupo sin aminoguanidina presentó un incremento significativo en la cantidad de nitritos cuantificados. La administración de Aminoguanidina 500 μ M disminuyó significativamente la actividad de la iNOS como pudo observarse al tener una baja concentración de nitritos o L-Citrulina al someter el tejido a un proceso de isquemia, reduciendo la cantidad cuantificada a un nivel comparable al observado en el grupo control.

Se pudo observar que ambas técnicas analíticas presentaron linealidad y especificidad, sin embargo se manifestó de sobremanera la dificultad para montar la técnica por CLAR, ya que el tipo de columna utilizada en los análisis es

delicada. En esta técnica el tratamiento de la muestra previo al análisis cromatográfico es de suma importancia, ya que la presencia de proteínas y macromoléculas en las alícuotas de muestra utilizadas, pueden causar oclusión y daño permanente a la columna.

En contraste, la técnica espectrofotométrica no requiere un tratamiento especial de la muestra, dado que el NO producido por el tejido, difunde libremente a través de las membranas celulares hacia el buffer en el que se encuentra incubado el tejido, es en este medio donde sufre oxidaciones sucesivas, formando nitritos y nitratos que pueden ser fácilmente detectados.

Por estas razones se decidió utilizar la técnica espectrofotométrica para medir la actividad de la sintasa de óxido nítrico, así como el efecto de los fármacos en los experimentos siguientes.

7.2 Efecto de la aminoguanidina.

Una vez decidida la técnica analítica a utilizar, se probaron diferentes concentraciones de aminoguanidina en animales no diabéticos para verificar que no se estuviese inhibiendo las sintasas constitutivas de manera no selectiva. Para este fin, se probaron concentraciones de 250, 500 y 1000 μM respectivamente tanto para condiciones control como de isquemia; los resultados pueden observarse en la Figura 22.

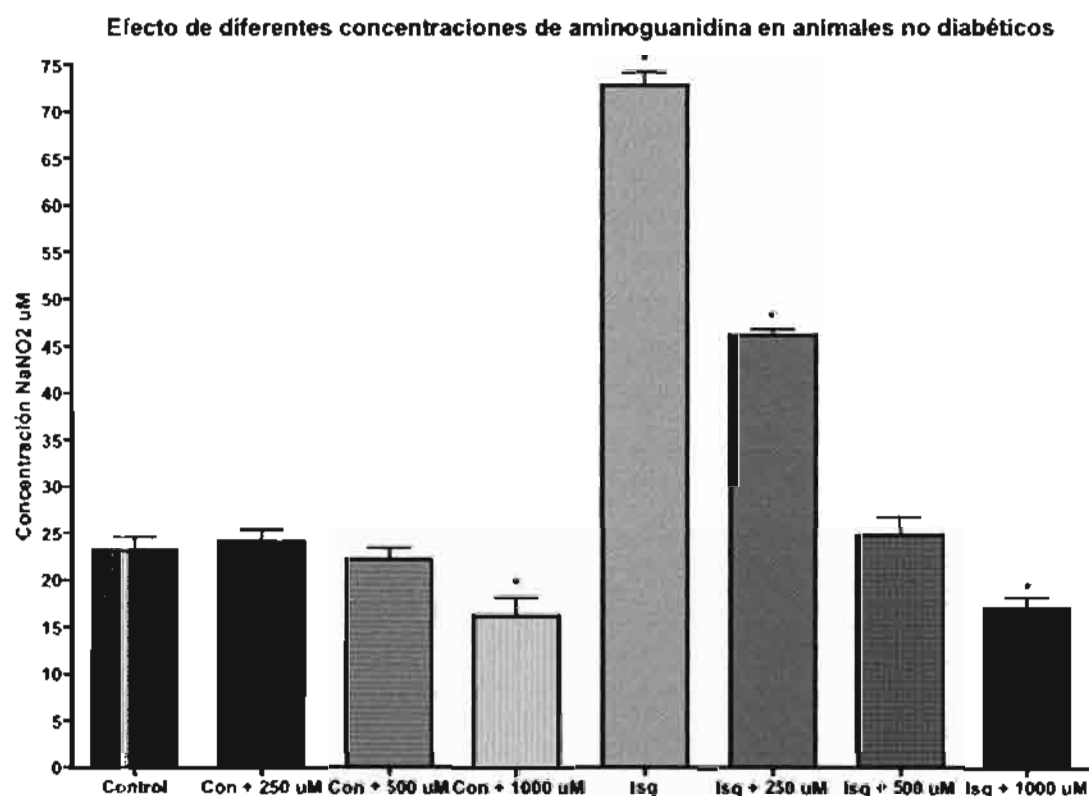


Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de aminoguanidina en ratas no diabéticas (n=6, Promedio \pm EEM, ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett *p<0.05).

Los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía, con prueba de Dunnet, para comparar contra el control.

Como pudo observarse en los tratamientos sin isquemia, la administración de aminoguanidina a 250 y 500 μM no fue estadísticamente diferente del grupo control, no siendo así la concentración de 1000 μM la cual fue significativamente

diferente del control. Al someter los tejidos a un proceso de isquemia, la administración de aminoguanidina en concentración de 250 μM redujo significativamente la cantidad de nitritos detectados, la concentración de 500 μM no resultó en una afectación de las sintasas constitutivas, ya que la cantidad de nitritos detectados no fue significativamente diferente de los niveles control, por su parte la concentración de 1000 μM dio lugar a una reducción significativa de los nitritos medidos a un nivel menor que el control. Se repitió el mismo estudio con animales diabéticos, para determinar el efecto de las diversas concentraciones de aminoguanidina en este modelo, realizándose también un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett para analizar los datos y determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Los resultados se pueden observar en la Figura 23.

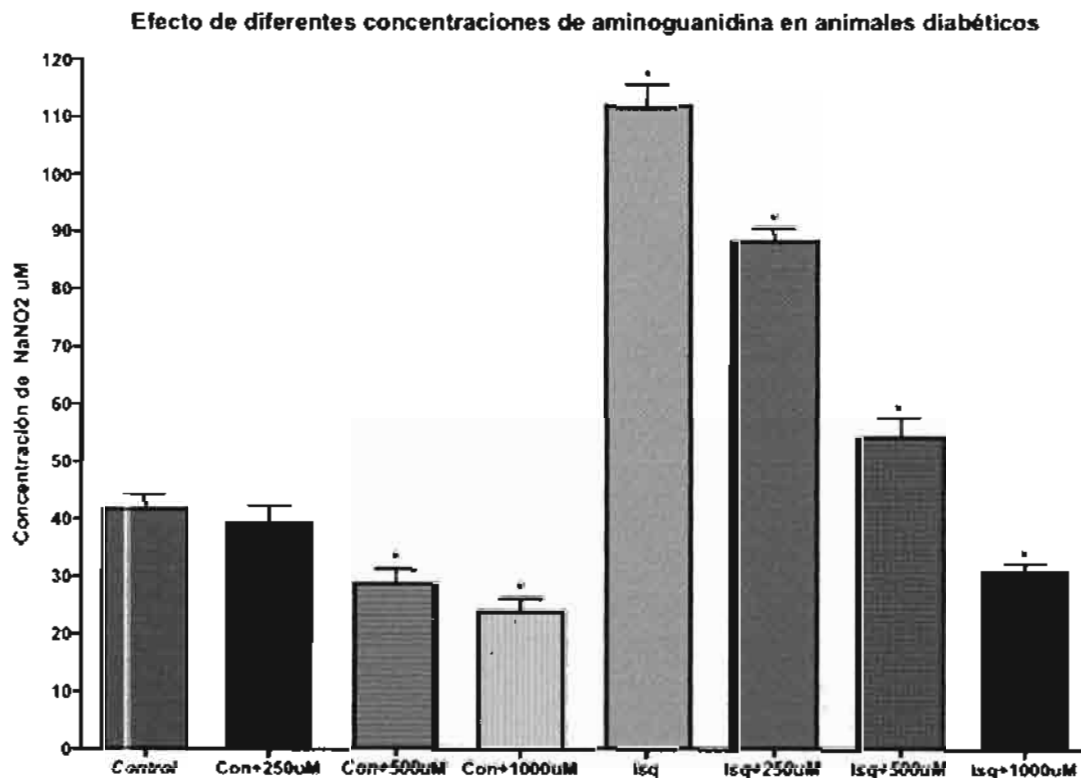


Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de aminoguanidina en ratas diabéticas (n=6, Promedio \pm EEM, ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett *p<0.05).

En este caso, con animales diabéticos se observó que las cantidades de nitritos medidas en los tejidos no sometidos a isquemia, sin tratamiento con

fármacos, son mucho más altas que las encontradas en animales no diabéticos. La concentración de 250 μM no presenta una diferencia significativa con respecto del control, sin embargo, las concentraciones de 500 y 1000 μM si presentan diferencias significativas con respecto del control. En el caso de las muestras sometidas a isquemia, presentan el mismo comportamiento observado en el experimento realizado en animales no diabéticos, con la diferencia que la concentración de 500 μM no alcanzó a reducir la cantidad de nitritos medidos al mismo nivel que el control. La concentración de 1000 μM en este caso reduce los nitritos detectados aún más que el control. Finalmente se realizó una comparación entre animales no diabéticos y diabéticos para determinar diferencias estadísticas tanto entre los tratamientos como la influencia de la diabetes mellitus en los resultados. Los resultados pueden observarse en la Figura 24.

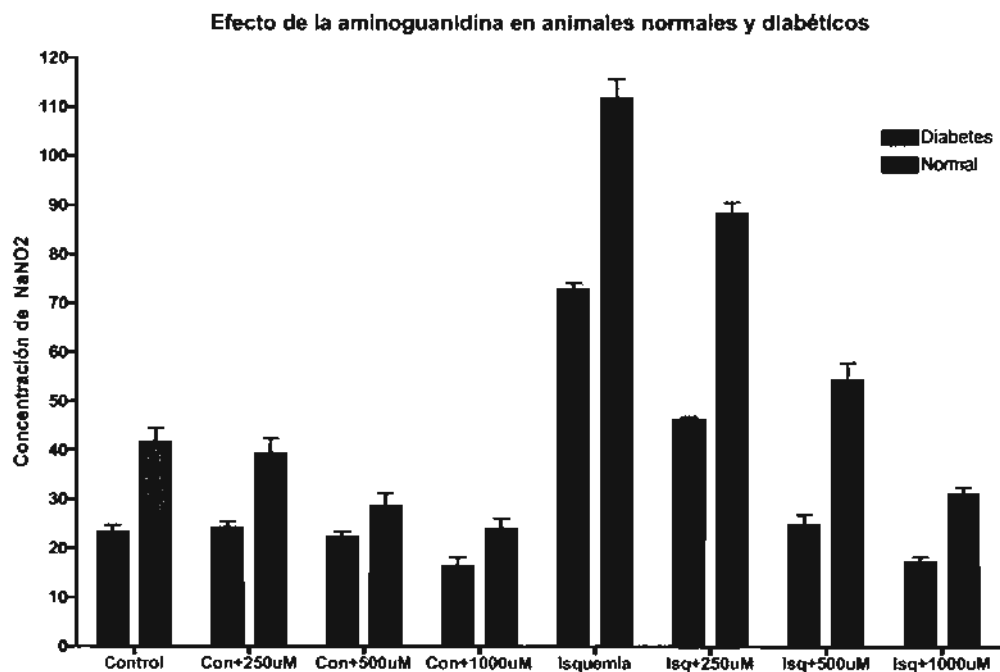


Figura 24. Comparaciones de las concentraciones de NaNO_2 de animales normales y diabéticos tratados con diferentes concentraciones de aminoguanidina

Se realizó un ANOVA de doble vía para observar las diferencias estadísticas entre ambos bloques de animales encontrándose que existe diferencia estadística ($p < 0.05$) tanto entre los bloques de animales normales y diabetes así como entre los tratamientos efectuados a las muestras, siendo la

diabetes la principal fuente de variación y en segundo lugar el tratamiento, la interacción también fue estadísticamente significativa.

7.3 Efecto de la dapsona.

Se realizaron mediciones de la misma manera que las anteriores con la adición de dapsona a concentraciones de 0.6, 1.2, 2.4 y 4.8 μM y posteriormente realizando un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett (Figura 25).

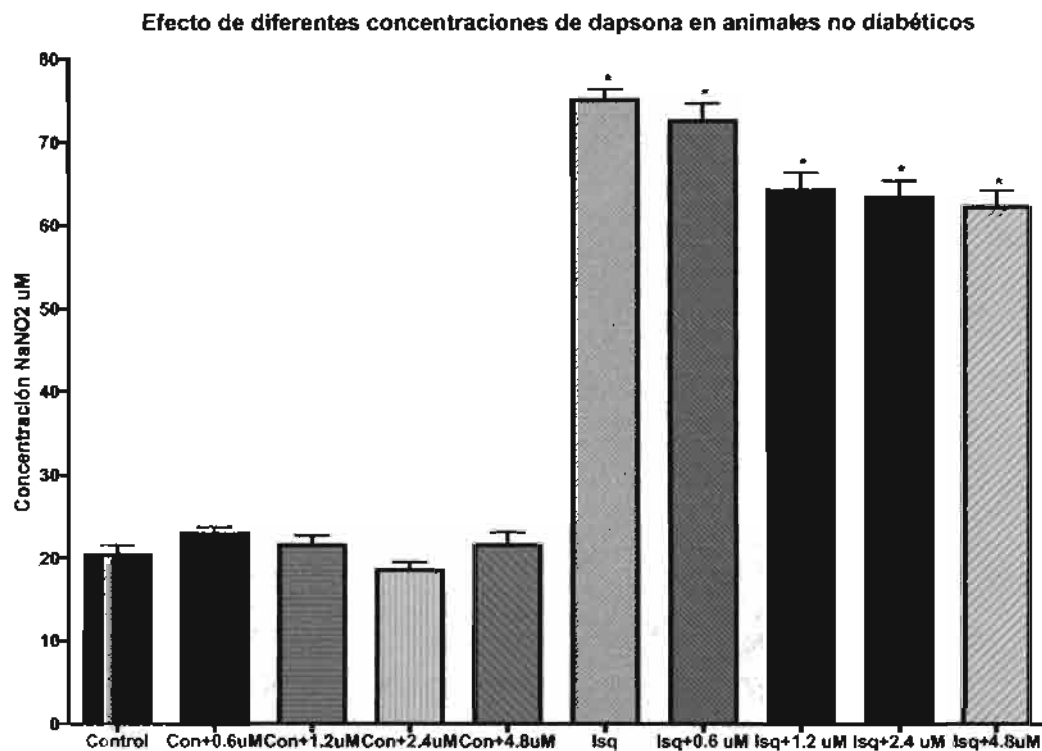


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de dapsona en ratas no diabéticas (n=6, Promedio \pm EEM, ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett * $p < 0.05$).

Al igual que en los experimentos con aminoguanidina, las concentraciones de nitritos medidas en las muestras que no fueron sometidas a isquemia, se mostraron en niveles basales, mostrando que la adición de dapsona no tiene actividad en la actividad basal de las sintasas de óxido nítrico.

Al someter las muestras a isquemia, se muestra que la dapsona tiene muy pequeño efecto en reducir la actividad de la iNOS, presentando una diferencia estadísticamente significativa con respecto del grupo isquémico sin tratamiento de dapsona. Esta reducción en la actividad es muy pequeña, para todas las

concentraciones de dapsona, a pesar de que los tratamientos a 1.2, 2.4 y 4.8 μM si mostraron concentraciones reducidas de nitritos con respecto de las muestras sometidas a isquemia sin dapsona sin llegar a los niveles basales.

Se repitió el mismo estudio utilizando animales diabéticos, los resultados se muestran en la Figura 26.

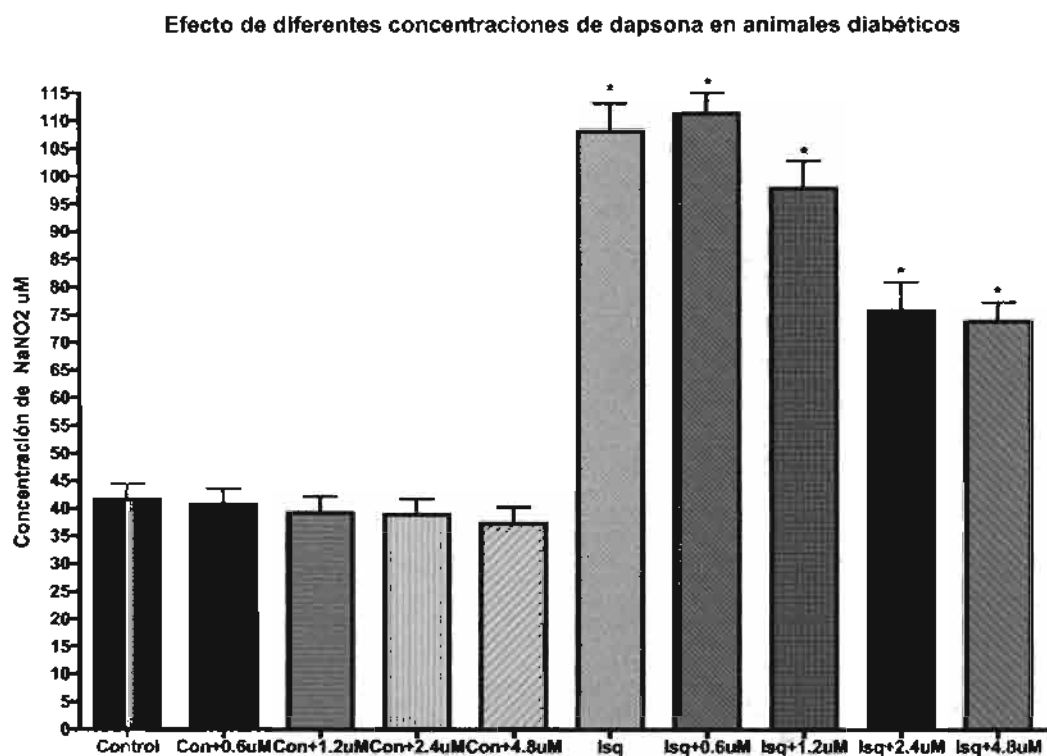


Figura 26. Efecto de diferentes concentraciones de dapsona en ratas diabéticas (n=6, Promedio \pm EEM, ANOVA de una vía seguida de prueba de Dunnett *p<0.05).

Al igual que en el experimento con aminoguanidina, se encontraron concentraciones basales de nitritos mucho más elevadas que en los animales no diabéticos. La adición de dapsona no ejerció un cambio significativo en las concentraciones basales de nitritos medidas en tejidos no sometidos a isquemia. Al someter a isquemia al igual que en los estudios previos, se alcanzaron concentraciones mucho más elevadas en comparación a los animales normales, la adición de dapsona en 0.6 μM no tuvo un efecto en decrecer las cantidades de nitritos producidas en tejido sometido a isquemia, pero si se observó un efecto en concentraciones de 1.2, 2.4 y 4.8 μM . Es de hacer notar que la concentración de

4.8 μM no disminuyo de una manera mayor la cantidad de nitritos determinados con respecto de la concentración de 2.4 μM . Por lo que se puede inferir que el efecto de la dapsona aún en estas condiciones es limitado.

Al igual que el estudio con aminoguanidina, se realizó una comparación entre animales no diabéticos y diabéticos para determinar diferencias estadísticas tanto entre los tratamientos como la influencia de la diabetes mellitus, como puede verse en la Figura 27.

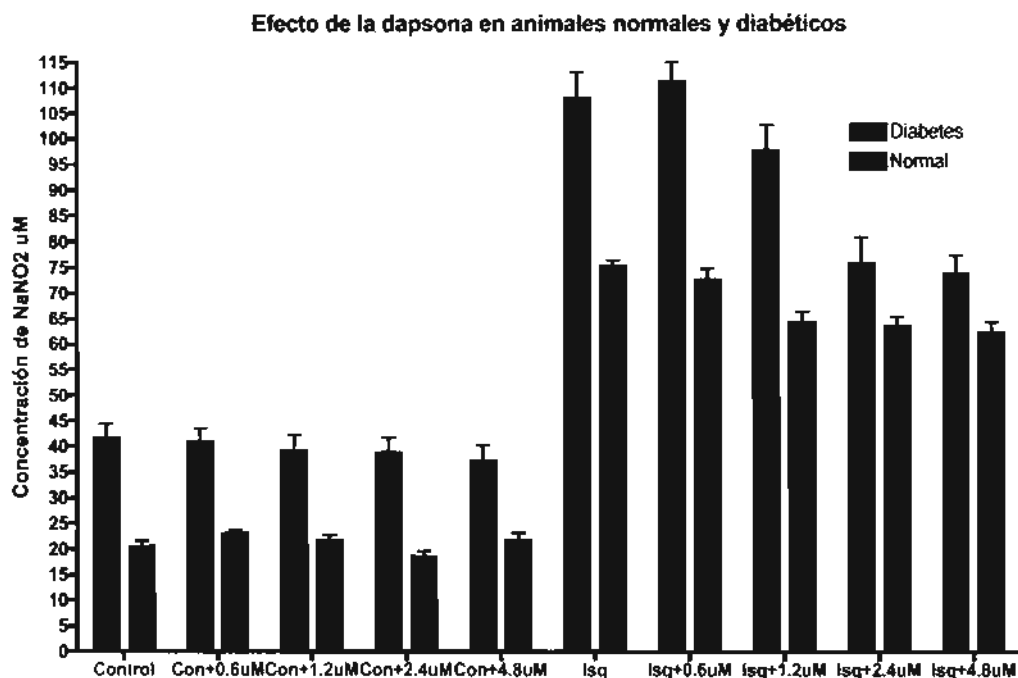


Figura 27. Comparaciones de las concentraciones de NaNO_2 de animales normales y diabéticos tratados con diferentes concentraciones de dapsona.

De igual manera que en el estudio anterior, se realizó a estos datos un ANOVA de doble vía, encontrándose que en efecto, hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los bloques de tipo de animal, así como entre el tipo de tratamiento, siendo la principal fuente de variación el tipo de animal. Con lo que podemos determinar que la diabetes es la que tiene la principal influencia en las diferencias estadísticas encontradas.

7.4 Efecto combinado de diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona.

Una vez realizados los estudios con diferentes concentraciones de los fármacos por si solos, se realizaron combinaciones usando estas mismas concentraciones, los valores obtenidos de concentraciones de nitritos se sometieron a un ANOVA de doble vía, encontrándose en todos los casos, que tanto las concentraciones de dapsona y aminoguanidina tienen participación significativa en la variación ($p < 0.05$), siendo mayor el efecto del tratamiento con aminoguanidina en todos los casos.

Se realizaron gráficos de superficie y curvas dosis-respuesta en cada caso para observar la tendencia del efecto combinado de ambos fármacos en cada caso.

- Efecto combinado en animales no diabéticos sin someter a isquemia.

		Aminoguanidina			
		0 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
Dapsona	0 μM	20.46 \pm 1.13	24.09 \pm 1.27	22.21 \pm 1.83	16.21 \pm 1.95
	0.6 μM	22.92 \pm 0.94	23.98 \pm 1.18	21.31 \pm 1.85	18.09 \pm 2.10
	1.2 μM	21.47 \pm 1.22	24.81 \pm 1.30	21.49 \pm 1.97	16.58 \pm 1.96
	2.4 μM	18.50 \pm 0.98	21.33 \pm 1.29	20.29 \pm 1.90	16.81 \pm 1.84

Tabla 3. Concentraciones de NaNO_2 al combinar diferentes concentraciones de dapsona y aminoguanidina en muestras de ratas no diabéticas sin someter a isquemia. (Promedio \pm EEM, $n=6$).

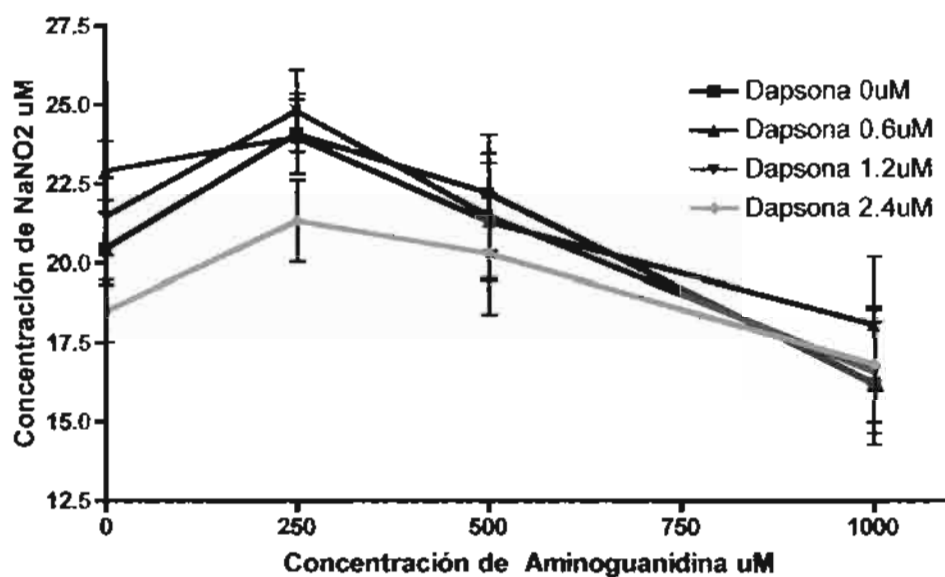


Figura 28. Curvas Dosis-Respuesta diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas no diabéticas sin isquemia. (n=6).

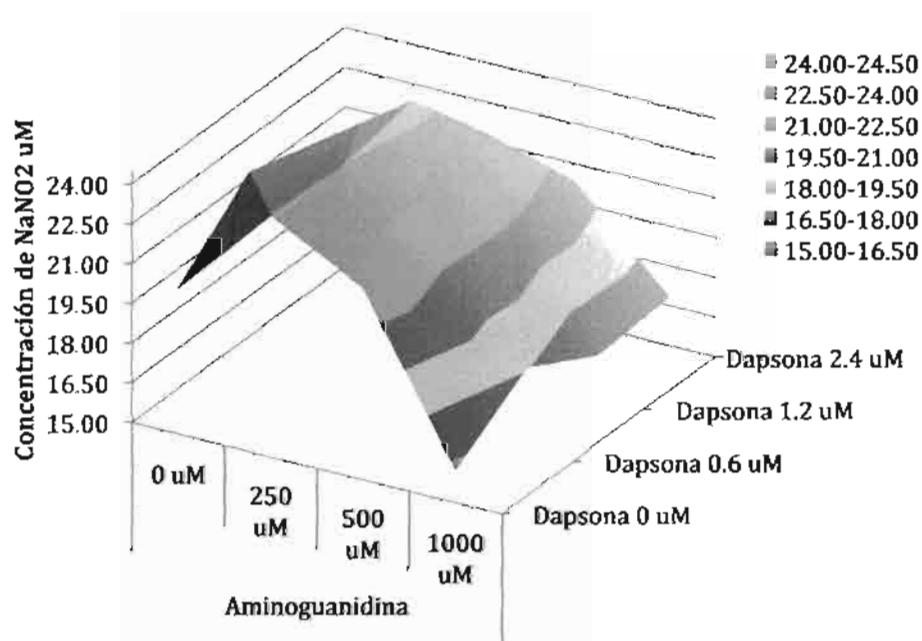


Figura 29. Efecto combinado de diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas no diabéticas sin isquemia. (n=6).

Como puede observarse en las Figuras 28 y 29, la tendencia es errática, en ausencia de aminoguanidina en las diferentes concentraciones de dapsona, sin embargo los valores están dentro de lo que puede esperarse en condiciones control. Conforme se incrementan las concentraciones de aminoguanidina se

observa una clara tendencia a la reducción en la producción de nitritos, con poco o nulo efecto de la dapsona en este caso.

- Efecto combinado en animales no diabéticos al someter a isquemia.

		Aminoguanidina			
		0 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
Dapsona	0 μM	75.27 \pm 1.96	46.18 \pm 1.65	24.78 \pm 2.02	17.06 \pm 1.82
	0.6 μM	72.52 \pm 2.04	45.67 \pm 1.74	23.48 \pm 1.99	15.70 \pm 1.96
	1.2 μM	64.12 \pm 2.12	44.16 \pm 1.69	23.04 \pm 1.85	17.91 \pm 1.84
	2.4 μM	63.30 \pm 2.01	46.49 \pm 1.67	20.73 \pm 1.92	15.17 \pm 1.94

Tabla 4. Concentraciones de NaNO_2 al combinar diferentes concentraciones de dapsona y aminoguanidina en muestras de ratas no diabéticas sometidas a isquemia. (Promedio \pm EEM, n=6).

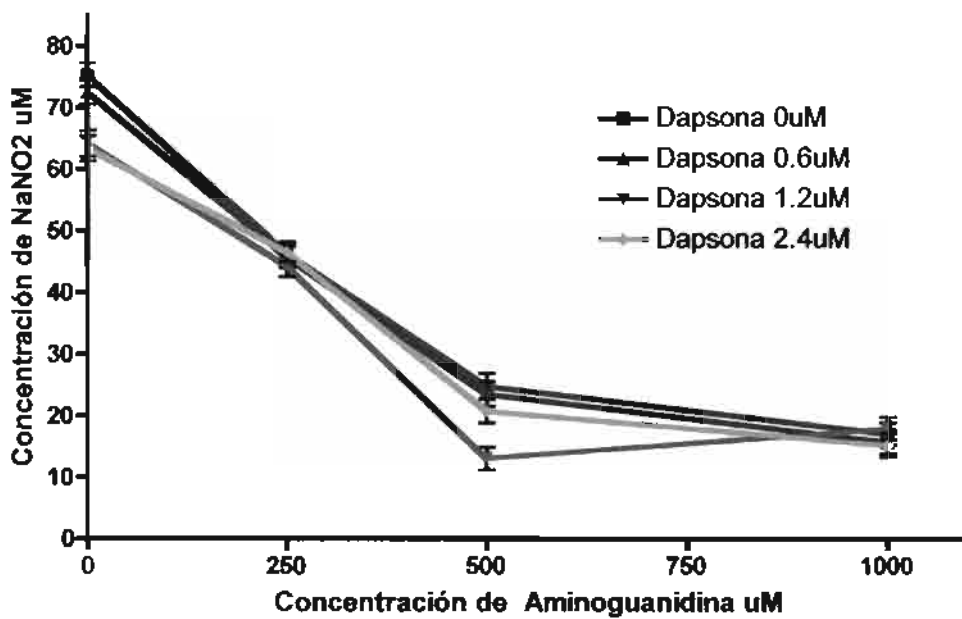


Figura 30. Curvas Dosis-Respuesta diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas no diabéticas sometidas a isquemia. (Promedio \pm EEM, n=6).

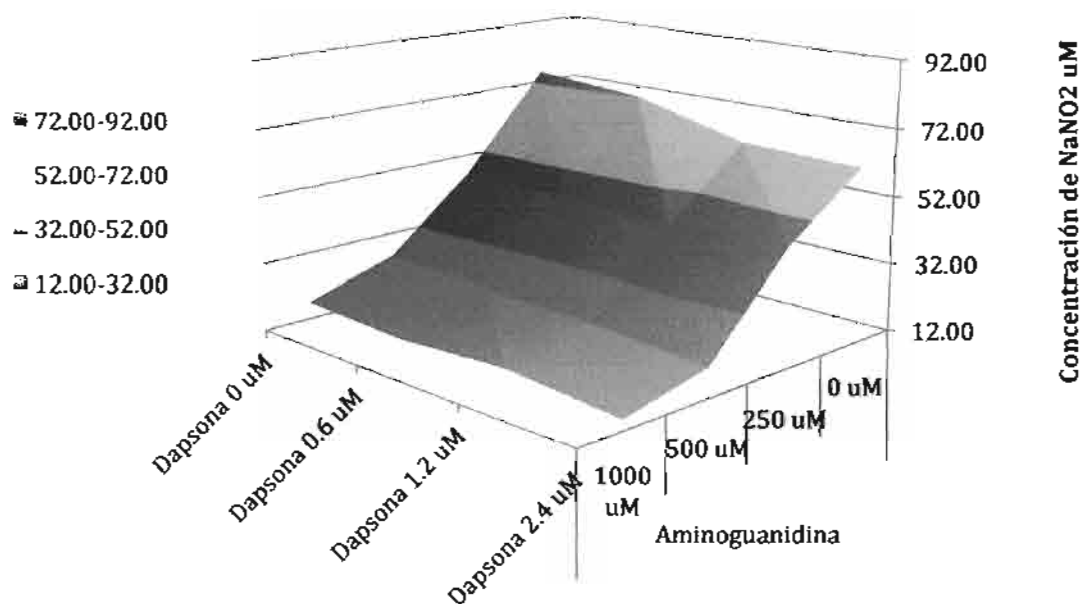


Figura 31. Efecto combinado de diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas no diabéticas sometidas a isquemia. (n=6).

En el caso de las muestras no diabéticas sometidas a isquemia, la tendencia se hace más patente, observándose claramente la marcada reducción ocasionada por la aminoguanidina y un efecto pequeño al incrementar las concentraciones de dapsona como puede verse en las Figuras 30 y 31.

- Efecto combinado en animales diabéticos sin someter a isquemia.

		Aminoguanidina			
		0 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
Dapsona	0 μM	41.58 \pm 2.79	39.27 \pm 3.1	28.54 \pm 2.02	23.88 \pm 2.06
	0.6 μM	40.69 \pm 2.64	41.56 \pm 2.84	29.80 \pm 2.35	23.13 \pm 1.89
	1.2 μM	39.05 \pm 2.85	35.07 \pm 2.87	26.64 \pm 1.97	19.86 \pm 1.97
	2.4 μM	38.69 \pm 2.91	36.89 \pm 2.99	25.25 \pm 2.08	12.13 \pm 2.02

Tabla 5. Concentraciones de NaNO₂ al combinar diferentes concentraciones de dapsona y aminoguanidina en muestras de ratas diabéticas sin someter a isquemia. (Promedio \pm EEM, n=6).

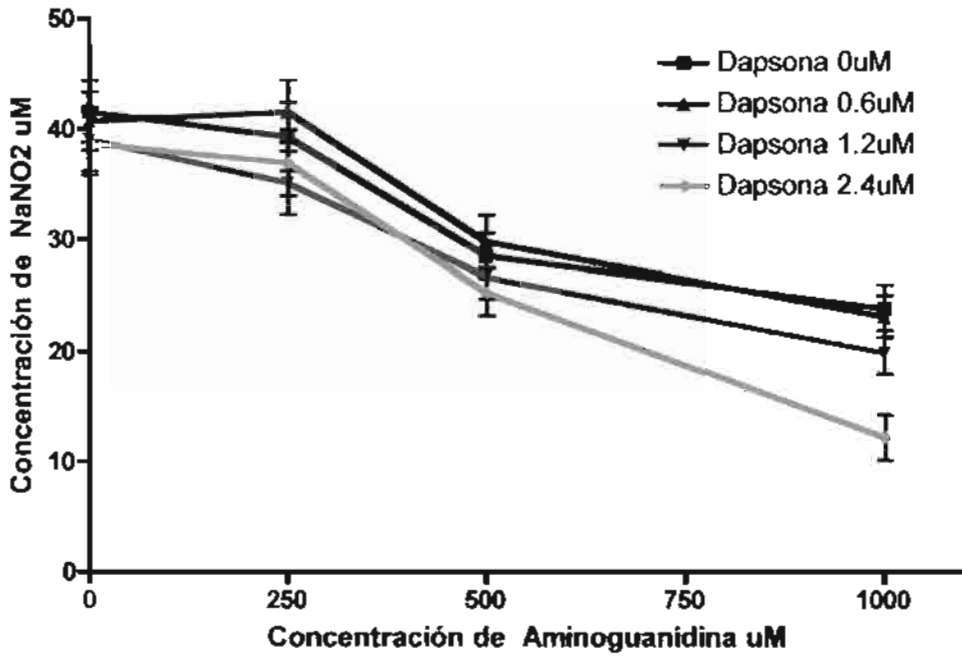


Figura 32. Curvas Dosis-Respuesta diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas diabéticas sin isquemia. (n=6).

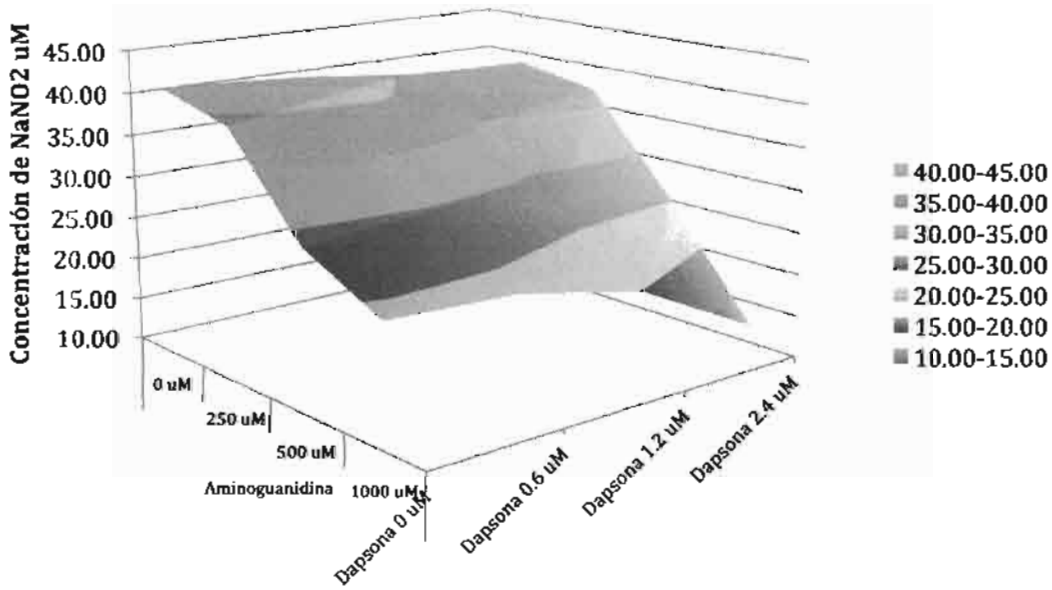


Figura 33. Efecto combinado de diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas diabéticas sin isquemia. (n=6).

En muestras de animales diabéticos no sometidas a isquemia, las concentraciones de nitritos de manera basal son mucho más altas que en

muestras de animales no diabéticos por inducción de la iNOS, y el efecto de los fármacos se hace mucho más evidente, repitiéndose la tendencia observada previamente, el mayor efecto en la reducción de las concentraciones de nitritos está dada por la aminoguanidina, y en menor grado por la dapsona, observándose un mayor efecto de la dapsona en concentraciones de 2.4 μM en combinación con 1000 μM de aminoguanidina.

- Efecto combinado en animales diabéticos al someter a isquemia.

		Aminoguanidina			
		0 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
Dapsona	0 μM	111.62 \pm 3.01	88.11 \pm 2.34	54.10 \pm 3.02	30.98 \pm 1.99
	0.6 μM	111.05 \pm 2.97	83.77 \pm 2.62	42.92 \pm 2.89	23.06 \pm 2.03
	1.2 μM	97.53 \pm 2.92	72.73 \pm 2.85	28.11 \pm 2.95	14.91 \pm 2.95
	2.4 μM	75.63 \pm 2.96	55.08 \pm 2.54	19.43 \pm 3.09	11.22 \pm 2.01

Tabla 6. Concentraciones de NaNO_2 al combinar diferentes concentraciones de dapsona y aminoguanidina en muestras de ratas diabéticas sometidas a isquemia. (Promedio \pm EEM, n=6).

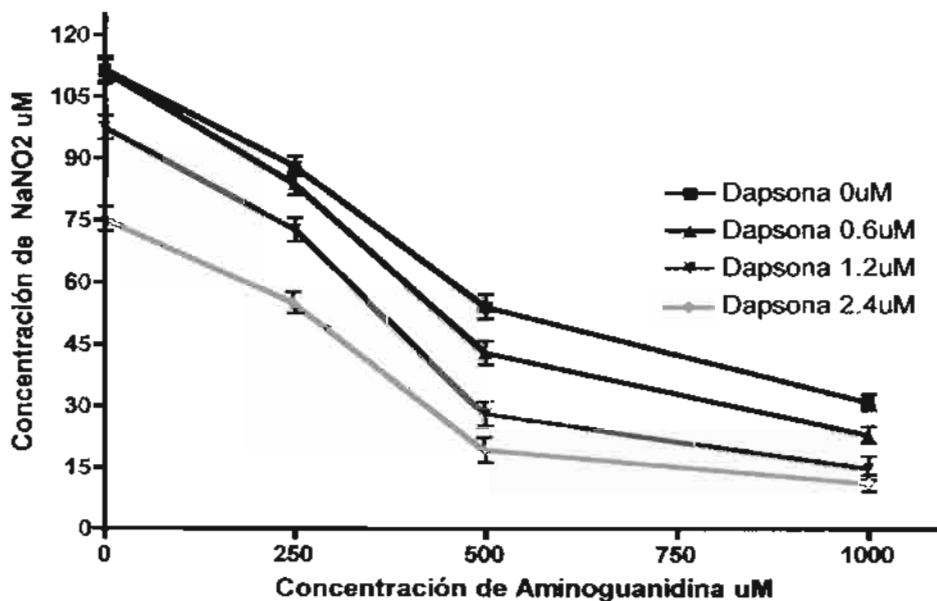


Figura 34. Curvas Dosis-Respuesta diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas diabéticas sometidas a isquemia. (n=6).

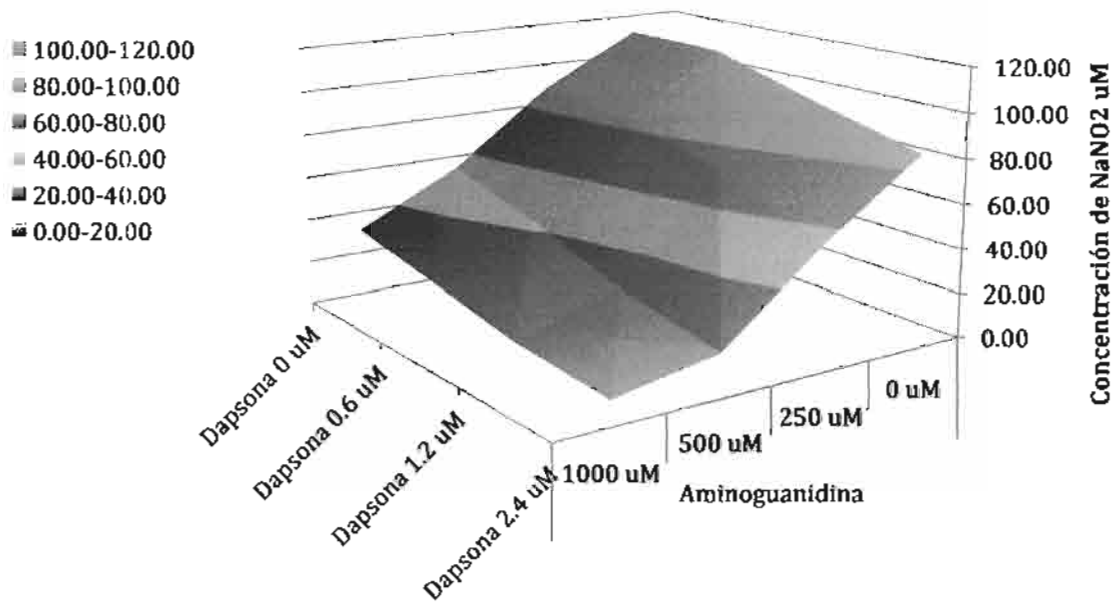


Figura 35. Efecto combinado de diferentes concentraciones de aminoguanidina y dapsona en muestras de ratas diabéticas sometidas a isquemia. (n=6).

La tendencia de nuevo se repite, el mayor efecto en reducir la concentración de nitritos es por parte de la aminoguanidina, en las Figuras 34 y 35 puede observarse que el efecto de la combinación de fármacos se presenta de manera más notoria en concentraciones combinadas de 500 μM de aminoguanidina con 1.2 μM de dapsona, observándose claramente una pendiente más pronunciada en la superficie graficada.

8. DISCUSIÓN.

Como parte de la justificación de la metodología utilizada en esta investigación, se realizó la comparación entre dos métodos analíticos para medir la producción de óxido nítrico.

Ambas metodologías presentaron una sensibilidad adecuada para la determinación indirecta de la producción de NO por la iNOS en las concentraciones que se producen en el tejido en investigación. En ambas técnicas tanto el grupo control, como en el grupo con aminoguanidina, se mantuvieron en los niveles basales, por lo que se puede concluirse que no hubo inducción de la iNOS en estas condiciones. Al inducirse un proceso isquémico, el grupo sin aminoguanidina presentó un evidente incremento significativo en la cantidad de nitritos cuantificados debido a la expresión y actividad de la iNOS. La administración de Aminoguanidina 500 μ M disminuyó significativamente la producción de óxido nítrico como pudo observarse al tener una baja concentración de nitritos o L-Citrulina al someter el tejido a un proceso de isquemia, reduciendo la cantidad de nitritos a un nivel que se aproxima a los valores basales del grupo control. Estos resultados son consistentes con lo observado en otros estudios, que corroboran la acción inhibitoria de la aminoguanidina (Corman y col., 1998; Misko y col., 1993; Wolff y Lubeskie, 1995).

Ambas técnicas analíticas mantienen linealidad y especificidad, sin embargo se manifestó de sobremanera la dificultad para montar la técnica por CLAR, ya que el tipo de columna utilizada en los análisis requiere de muchos cuidados. Se encontró que el tratamiento de la muestra, previo al análisis cromatográfico es de suma importancia, ya que la presencia de proteínas y macromoléculas en las alícuotas de muestra utilizadas, pueden causar oclusión y daño permanente a la columna, como ocurrió en los experimentos preliminares. Por lo que se decidió recurrir a un método sencillo de desproteinización mediante un proceso de centrifugación descrito previamente (Perez–Neri, y col., 2007).

En contraste, la técnica espectrofotométrica no requiere un tratamiento especial de la muestra, dado que el NO producido por el tejido, difunde libremente

a través de las membranas celulares hacia el buffer en el que se encuentra incubado el tejido, es en este medio donde sufre oxidaciones sucesivas, formando Nitritos y Nitratos. La reducción de estos nitratos a nitritos puede dar lugar a una pérdida en la cuantificación total de los mismos (Miranda y col., 2001). Lo que podría explicar el hecho de que en los resultados observados, las concentraciones determinadas por CLAR han sido ligeramente mayores que las encontradas por espectrofotometría. Este fenómeno se pudo observar en mayor grado al producirse una cantidad mayor de óxido nítrico, en el grupo isquémico sin inhibidor. Las altas concentraciones de NO producidos, por ende dan lugar a una mayor concentración de nitratos, los cuales pueden no haber sido reducidos por el VCl_3 y no haber sido sujetos a la reacción de Griess, por lo que no se pudieron detectar completamente. Por su parte la CLAR no tiene este problema ya que la cuantificación de L-citrulina se realiza de manera directa sin acción de ninguna reacción previa (Carlberg, 1994).

Ambos métodos tienen utilidad en investigación farmacológica donde se necesite verificar la actividad de la iNOS, en procesos fisiológicos donde esta se encuentre elevada. En cuanto a costos materiales, ambas técnicas son virtualmente equivalentes en cuanto a los precios de los reactivos a utilizar, sin embargo la diferencia en el tiempo de análisis influyó enormemente en la decisión de elegir el método espectrofotométrico, dado que presenta adecuada sensibilidad dando resultados confiables.

La mayoría de los estudios publicados sobre aminoguanidina, se enfocan en el efecto de la misma para inhibir la formación de productos de glicosilación avanzada (Zimmerman y col., 1995; Makita y col., 1995; Cameron y Cotter, 1996) y solo se menciona su uso como inhibidor farmacológico de la iNOS en el caso de la medición de la actividad de esta enzima.

La aminoguanidina al ser un agente inhibidor selectivo de la iNOS disminuye la actividad de esta enzima reduciendo la cantidad de óxido nítrico producido en procesos de isquemia reperusión, por lo que se puede asumir que su actividad confiere un efecto neuroprotector (Zimmerman y col., 1995).

Pudo observarse que disminuir la dosis administrada de aminoguanidina a 250 μM no ocasiona una reducción de las concentraciones de nitritos medidas comparables a los niveles encontrados en un control no sometido a isquemia; a su vez, el incremento de la dosis a 1000 μM mostró una reducción significativa de las concentraciones de nitritos medidas con respecto del control, por lo que se puede observar que en dosis muy elevadas de aminoguanidina, ésta pierde la especificidad por la iNOS y comienza a inhibir las sintasas constitutivas, en el caso de este tejido principalmente la nNOS.

La administración de aminoguanidina 500 μM a las rebanadas de *corpus striatum* provenientes de animales no diabéticos, mostró resultados muy semejantes a los observados en los experimentos realizados anteriormente. Se puede observar claramente que el proceso de isquemia-reperfusión incrementa de manera significativa la cantidad de nitritos cuantificados en las muestras, y la presencia de aminoguanidina reduce esta concentración de nitritos a cantidades comparables a los controles no sometidos a proceso de isquemia-reperfusión. Por su parte el experimento realizado animales diabéticos mostró concentraciones basales de nitritos mucho más elevadas que las observadas en animales no diabéticos, éstos resultados son consistentes con los hallazgos reportados en la literatura en los cuales se cita expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico por consecuencia de la diabetes en diversos tejidos del cuerpo (Bardell y MacLeod, 2001; Song y col., 2008; Corbett y Daniel, 1996); en este caso, el cerebro no es la excepción. Un hallazgo que importante destacar es que la administración de aminoguanidina en una muestra de tejido diabético no sometido a isquemia, mostró una disminución en la concentración de nitritos cuantificada por lo que se puede asumir que es resultado de la inhibición de la iNOS que se expresó por consecuencia de la diabetes. En el caso de las muestras de tejido sometidas a isquemia, se observa también un marcado incremento en la concentración de nitritos y la adición de aminoguanidina disminuye la concentración de los mismos a niveles comparables al control no isquémico.

La administración de dapsona 1.2 μM a muestras de animales no diabéticos no mostró tener efecto ya que no se observaron diferencias significativas entre las

cantidades de nitritos obtenidas de muestras no isquémicas con y sin adición de dapsona. Las muestras sometidas a isquemia sin dapsona tuvieron el mismo incremento dramático en la concentración de nitritos medida sin embargo, la adición de dapsona a muestras isquémicas no mostró una marcada reducción de las cantidades de nitrito producidas. Este mismo comportamiento pudo observarse en los resultados del experimento realizado a muestras de animales diabéticos en éstos de igual forma, la dapsona no altera las concentraciones de nitritos determinados en muestras no isquémicas, sin embargo presenta una pequeña reducción en los nitritos cuantificados al someter las muestras a isquemia. Con estos resultados pudimos demostrar que a pesar de tener un mecanismo de regulación de la actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico, éste no es tan eficaz como el observado por el inhibidor específico; además se observó que no tiene un efecto en tejido diabético no sometido a isquemia, a diferencia de la aminoguánidina, la cual si mostró una reducción en la cantidad de nitritos producidos.

El poco efecto de la dapsona sobre la actividad de la iNOS durante la isquemia, puede tener su explicación en el mecanismo de acción propuesto para la dapsona, que es el de proporcionar un efecto antioxidante en casos de estrés oxidativo (Corbett y McDaniel, 1996) como el que ocurre durante el proceso de isquemia-reperfusión (Rodríguez y col., 1999).

Durante los procesos de isquemia-reperfusión hay producción de radicales libres tales como iones superóxido, los cuales interactúan con el óxido nítrico formando peroxinitritos que posteriormente causarán daño a los tejidos mediante peroxidación de lípidos dando como consecuencia muerte celular (Díaz-Ruiz y col., 2008; Xia y col., 1996; Stamler y col., 1992). La muerte celular da como resultado la liberación de mediadores de la inflamación como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN γ , que favorecen la activación de la ruta bioquímica de expresión de la iNOS, teniéndose un ciclo de retroalimentación que da como resultado un incremento muy notable en la producción de óxido nítrico; asimismo se sabe que las especies reactivas de oxígeno por si solas promueven la transcripción genética de la iNOS a mediante la activación del NF- κ B, que en turno incrementa las concentraciones

de NO, al mismo tiempo, en caso de estrés oxidativo, esta cantidad incrementada de NO interactúa con aniones superóxido, ocasionando un ciclo en el cual se forma más peroxinitrito que consecuentemente aumentará el daño celular liberándose factores de inflamación, daño celular, y una mayor expresión de la iNOS y una mayor producción de óxido nítrico. Un esquema que resume este proceso puede observarse en la Figura 36. La dapsona al tener un efecto antioxidante, puede disminuir la formación de estas especies reactivas de oxígeno, minimizando el daño celular y disminuyendo la expresión de la iNOS.

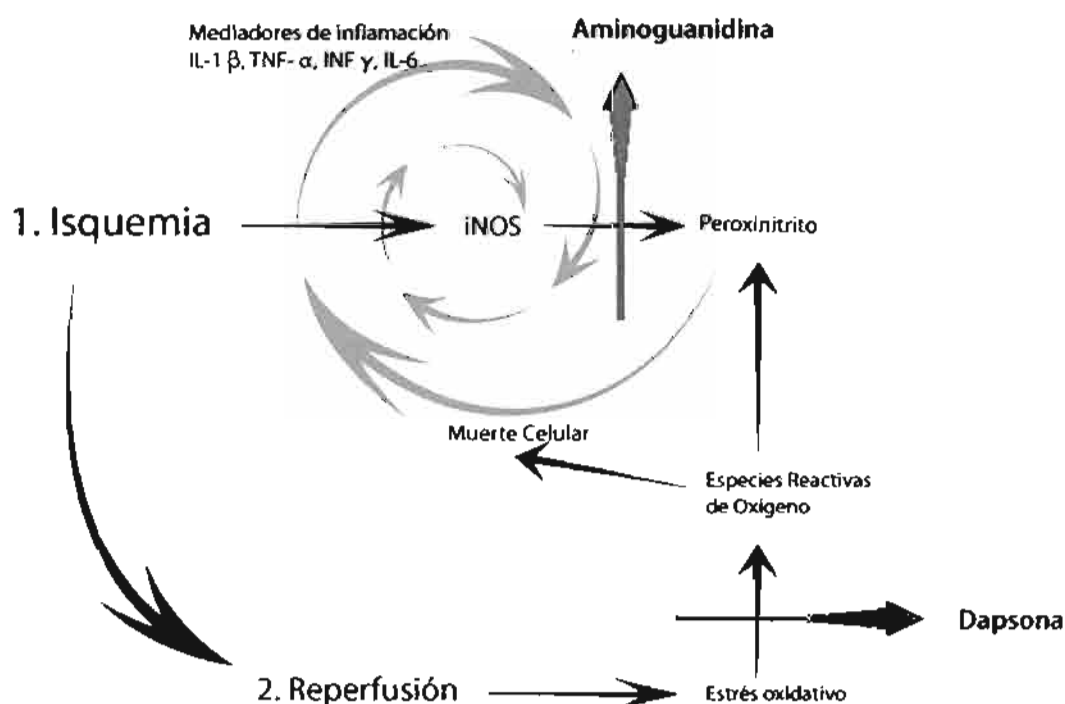


Figura 36. Mecanismos del daño celular en procesos de isquemia-reperfusion, en rojo la acción de la dapsona y en verde la acción de la aminoguanidina.

Por su parte, la aminoguanidina, al inhibir la actividad de la sintasa de óxido nítrico de manera directa, también disminuye el daño celular, previniendo la formación de peroxinitritos y por consiguiente la muerte celular. Puede observarse que a través de dos mecanismos se puede disminuir la muerte celular, sin embargo, la influencia de la dapsona por si sola disminuye la actividad de la sintasa de óxido nítrico en menor grado.

Al probar diferentes concentraciones de aminoguanidina sola, se corroboró que, en efecto la administración de aminoguanidina a 250 μM no ocasiona una reducción significativa de las concentraciones de nitritos medidas en comparación a los niveles encontrados muestras control no sometidas a isquemia, de igual manera ocurre con las muestras tratadas con 500 μM ; a su vez, el incremento de la dosis a 1000 μM mostró una reducción significativa de las concentraciones de nitritos medidas con respecto del control, por lo que se puede observar que en dosis muy elevadas de aminoguanidina, ésta pierde la especificidad por la iNOS e inhibe las sintasas constitutivas. Este comportamiento también se observó en las muestras de animales no diabéticos sometidas a isquemia, encontrándose de nuevo que la dosis de 500 μM retorna las cantidades de nitritos producidos a niveles comparables al control.

Al realizar el mismo estudio en animales diabéticos, se puede observar que aún las muestras no sometidas a isquemia, presentan sensibilidad al efecto de las concentraciones incrementales de aminoguanidina, esto puede deberse a que la diabetes mellitus por si misma favorece la expresión de la iNOS (Zimmerman y col., 1995; Makita y col., 1995), y por lo tanto observamos concentraciones basales de nitritos mayores, que en muestras de animales no diabéticos. En este caso, la concentración de 500 μM de aminoguanidina en muestras diabéticas no isquémicas, si presenta una reducción significativa con respecto del control, al igual que la concentración de 1000 μM . Para los tejidos diabéticos sometidos a isquemia, el efecto es de igual manera, dependiente de la dosis, observándose que en efecto, es la concentración de 500 μM la que más se acerca a los niveles observados en el control.

Los experimentos con dapsona por si sola, dieron resultados muy limitados, ya que el efecto observado fue muy pequeño, y solo en concentraciones de 1.2 y 2.4 μM en tejidos sometidos a isquemia, tanto normales como diabéticos se observa una diferencia significativa. La dapsona no tuvo un efecto discernible en tejidos no sometidos a isquemia. La dapsona no tuvo un efecto estadísticamente significativo en tejidos no sometidos a isquemia, por lo que se sugiere que su mecanismo de acción sobre la producción de nitritos y nitratos es indirecto y

confirma que es el resultado de su capacidad anti-oxidante y anti-inflamatoria (Díaz-Ruiz y col., 2008).

Al administrar los fármacos combinados, se observó que la mayor parte del efecto está dado por parte de la aminoguanidina y en menor medida por la dapsona, se puede ver que el efecto de la dapsona es aditivo, pues el efecto combinado es igual a la suma de los efectos individuales. Esto se observa de manera especial en tejidos sometidos a isquemia y diabéticos, ya que en el tejido no isquémico sin diabetes, no hubo cambios en la cantidad de nitritos observados por efecto de la dapsona y cuando se administra aminoguanidina en concentración de 1000 μM si se observan cambios significativos. En el caso de las muestras diabéticas sometidas a isquemia, se pudo observar claramente que la tendencia de potenciación de efecto, se inicia al combinar 500 μM de aminoguanidina con 1.2 μM de dapsona. Dado que no hay estudios publicados que hayan comparado combinaciones de estos dos fármacos, la explicación para esta potenciación puede estar dada en el mecanismo de acción de la dapsona, el cual se ha propuesto como un efecto antioxidante (Ríos y col., 2004; Díaz-Ruiz y col., 2008) durante proceso de estrés oxidativo que se presenta durante el proceso de isquemia-reperfusión el cual se está favoreciendo mediante este modelo.

El óxido nítrico por si mismo puede ser considerado como una especie reactiva de oxígeno en si misma (Abu-Soud y col., 1996). Cuando se utilizan elevadas de aminoguanidina, ésta pierde su especificidad por la sintasa inducible de óxido nítrico, y empieza a inhibir las sintasas constitutivas, reduciendo en general la producción de óxido nítrico y por ende la cantidad de nitritos detectados.

La adición de dapsona en este caso, puede inactivar el óxido nítrico por si misma, disminuyendo la cantidad de nitritos detectables. Dado que la producción de óxido nítrico está inhibida de manera y no hay un reestablecimiento de su concentración normal, la inactivación del óxido nítrico por efecto de la dapsona podría estarse dando a una velocidad menor que en la que se produce; dando lugar a una inhibición muy limitada; Sin embargo en combinación con la aminoguanidina da lugar a efecto aditivo inhibitor de la iNOS.

9. CONCLUSIONES.

A través del presente trabajo se obtuvo evidencia de la eficacia de la aminoguanidina para inhibir selectivamente la actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico en un modelo *in vitro* de isquemia-reperfusión, así como de la limitada influencia de la adición de dapsona en la inhibición de ésta enzima.

Por su parte, se observó que la adición de los dos fármacos en combinación presentaron un efecto aditivo, el cual fue más notoriamente observado en los tejidos que fueron sometidos a procesos de isquemia en animales diabéticos, encontrándose que concentraciones de aminoguanidina de 500 μM y de 2.4 μM de dapsona fueron las que redujeron las concentraciones de nitritos detectadas a niveles lo más cercanos a los controles.

El incrementar la concentración de aminoguanidina ocasiona que se inhiba a las sintasas constitutivas, por lo que podrían darse efectos tóxicos en los tejidos; asimismo el incremento de la concentración de dapsona solo presentó un efecto significativo en tejidos sometidos a isquemia, tanto en animales diabéticos como no diabéticos.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, hay buenas expectativas para la utilización de la combinación de aminoguanidina y dapsona como agente neuroprotector en modelos de isquemia-reperfusión siendo posible un futuro trabajo en el que se hagan pruebas en un modelo *in vivo*, tal como en el que se verificó la acción neuroprotectora de la dapsona, y así observar la eficacia de esta combinación de fármacos en una situación más apegada a la realidad.

10. REFERENCIAS.

1. Abu-Soud H.M., Rousseau D.L. and Stuehr D.J. 1996. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 32515–32518.
2. Abu-Soud H.M., Yoho L.L., Stuehr D.J. 1994. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 32047–32050.
3. Aguilar C.A., Gómez F.J. 2006. Declaración de Acapulco: propuesta para la reducción de la incidencia de la diabetes en México. *Revista de investigación clínica*, 58(1): 71-77.
4. Aguilar-Bryan L., Bryan J. 1999 Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrinology Reviews*. 20:101-135.
5. Alderton W., Angell A., Clayton N., Craig C., Dawson J., Frend A., McGill J., Mangel A., Moncada S., Rees D. y col. 2000. GW274150 is a potent, long-acting, highly-selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) with therapeutic potential in post-operative ileus. In *Biology of Nitric Oxide*, vol. 7 (Moncada, S., Gustaffson, L. E., Wiklund, N. P. and Higgs, E. A., eds.), pp. 22, Portland Press, London.
6. Ames A.I., Wright R.L., Kowada M, Thurston JM y Majno G. 1968. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. *American Journal of Pathology*. 52:437-453.
7. Amoroso S., Schmid-Antomarchi H., Fosset M. y Lazdunski M. 1990. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K⁺ channels. *Science*. 247:852-854.
8. Arango-Dávila C., Escobar-Betancourt M., Cardona-Gómez G.P. y Pimienta-Jiménez H. 2004. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Revista de neurología*. 39(2):156-165.
9. Arredondo A., Barceló A. 2007. The economic burden of out-of-pocket medical expenditures for patients seeking diabetes care in Mexico, *Diabetologia*, vol. 50, pp. 2408-2409.

10. Arredondo A., Zúñiga A. 2004. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle income countries. *Diabetes Care*, vol. 27, pp. 104-109
11. Ashcroft F.M. y Gribble F.M. 2000. New windows on the mechanism of action of KATP channel openers. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21:439-445.
12. Astrup J., Symon L., Branston N.M. y Lassen N.A. 1977. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. 8:51-57.
13. Babenko A.P., Aguilar-Bryan L. y Bryan J. 1998. A view of SUR/Kir6.X, KATP channels. *Annual Reviews on Physiology*. 60:667-687.
14. Banasiak K.J., Xia Y. y Hadad G.G. 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 62:215-249.
15. Bardell A.L., MacLeod K.M. 2001. Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 296(2):252-9.
16. Barnett D.M., Krall L.P. 2006. The history of diabetes. En: Kahn C.R., Weir G.C., King G.L., Moses A.C., Smith R.J., Jacobson A.M. (eds.), *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 687- 710.
17. Bear, M. F., Connors, B.W. & Paradiso M. A. 2001. *Neuroscience: Exploring the Brain*, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, pp 473-482
18. Bennet P.H., Knowler W.C. 2006. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. En: Kahn C.R., Weir G.C., King G.L., Moses A.C., Smith R.J., Jacobson AM. (eds.), *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 687-710.
19. Bentivoglio, M. 1996. 1896–1996: The Centennial of the Axon. *Brain Research Bulletin* 41(6):319-325
20. Bentivoglio, M. 1998. Cortical structures and mental skills. Oskar Vogt and the legacy of Lenin's brain. *Brain Research Bulletin* 47(4):291-296.
21. Bommel H.M., Reif A., Frohlich L.G., Frey A., Hofmann H., Marecak D.M., Groehn V., Kotsonis P., La M., Koster S. y col. 1998. Anti-pterins as tools to

- characterize the function of tetrahydrobiopterin in NO synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 33142–33149
22. Boyle W.A. 3rd, Parvathaneni L.S., Bourlier V., Sauter C., Laubach V.E., Cobb J.P. 2000. iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circulation Research*. 87(7):E18-24.
23. Bozeman P., Learn D., Thomas E. 1990. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of Immunological Methods*. 126:125-133.
24. Bozeman P., Learn D., Thomas E. 1992. Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochemical Pharmacology*. 44:553-563.
25. Branston N.M., Strong A.J. y Symon L. 1997. Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. *Journal of Neurological Sciences* 32:305-321.
26. Brini M. y Carafoli E. 2000. Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:354-370.
27. Bryk, R. and Wolff, D. J. (1999) Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 84, 157–178.
28. Bures J., Buresova O. y Krivanek J. 1974. The mechanisms and applications of Leao's spreading depression of electroencephalographic activity. Academic Press Inc. N.Y. 410 páginas.
29. Burke C.J., Tobler P.N., Baddeley M., Schultz W. 2010. Neuronal mechanisms of observational learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences(USA)* 107: 14431-14436.
30. Cameron N.E., Cotter M.A. 1996. Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular effects of diabetes in rats: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism*. 45(9): 1147-52.
31. Carlberg M. 1994. Assay of Neuronal Nitric Oxide by HPLC determination of L - Citrulline. *Journal of Neuroscience Methods*. 52: 165 - 16731.

32. Chan P.H. 1999. Oxygen radicals in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology (Walz W. ed) Human Press Totowa, NJ 5:105-123.
33. Chaves Sell F. 2000. Accidente Vascular Cerebral: ¿Es el accidente vascular cerebral una enfermedad tratable? Revista Costarricense de Cardiología. 2:1:27-33.
34. Chen P.F., Tsai A.L., Berka V. and Wu K.K. 1996. Endothelial nitric-oxide synthase. Evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 14631–14635
35. Cohen M.V., Baines C.P. y Downey J.M. 2000. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annual Review of Physiology* 62:79-109.
36. Cooper C.E. 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1411: 290–309.
37. Corbett D. y Crooks P. 1997. Ischemic preconditioning: a long-term survival study using behavioral and histological endpoints. *Brain Research*. 760:129-136.
38. Corbett J.A., McDaniel M.L. 1996. The Use of Aminoguanidine, a Selective iNOS Inhibitor, to evaluate the Role of Nitric Oxide in the Development of Autoimmune Diabetes. *Methods*. 10(1):21-30.
39. Córdoba-Villalobos J.A., Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda A, Barquera S, Rosas-Peralta M, Hernández-Ávila M, de León-May ME, Aguilar-Salinas CA. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*, 50(5): 419-427.
40. Corman B., Duriez M., Poitevin P., Heudes D., Bruneval P., Tedgui A., Levy B.I. 1998. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95:1301-1306.
41. Corvera-Bernardelli J., Corvera-Behar G. y Martín-Armendáriz L. 1999. Enfermedad Vascular Cerebral in Programa de Actualización Continua para Médicos Generales Parte B, Libro 2. Intersistemas S.A. de C.V. México. <http://www.drscope.com/pac/mg/b2>

42. Crane B.R., Arvai A.S., Ghosh D.K., Wu C., Getzoff E.D., Stuehr D.J., Tainer J. A. 1998. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*. 279: 2121–2126
43. Daff S., Sagami I., Shimizu, T. 1999. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 30589–30595.
44. Daube J.R., Reagan T.J., Sandok B.A. y Westmoreland B.F. (1986) *Medical neurosciences. The vascular system*. 2a ed. Little, Brown and Company. 11:229-242.
45. Dave K.R., Saul I., Busto R., Ginsberg M.D., Sick T.J. Pérez-Pinzón M.A. 2001. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 21:1401-1410.
46. Dawn B. y Bolli R. 2002. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 963:18-41.
47. Dawson V.L. y Dawson T.M. 2000. Neuronal ischemic preconditioning. *Trends in Pharmacological Sciences* 21:423-424.
48. Del Valle H.F., Negroni J.A. y Lascano E.C. 2003. Precondicionamiento cardíaco: protección miocárdica endógena contra el infarto, las arritmias y la disfunción contráctil post-isquémica. Primera parte. Precondicionamiento isquémico clásico. *Revista federal Argentina de cardiología*. 32:377-399.
49. Díaz-Ruiz A., Zavala C., Montes S. 2008. Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperfusion in rats. *Neuroscience Research*. 86 (15): 3410–9.
50. Díez-Tejedor E. 2001. Nomenclatura de las enfermedades cerebrovasculares. *Revista ecuatoriana de neurología*. Vol.10 No. 3.
51. Dirnagl U., Iadecola C. y Moskowitz M.A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22:391-397.
52. Eissa N.T., Strauss A.J., Haggerty C.M., Choo E.K., Chu S.C. and Moss J. 1996. Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA.

- Tissue-specific regulation and induction by cytokines. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 27184–27187.
53. Ekoé J.M., Zimmet P.Z., 2008. Diagnosis and classification. En: Zimmet P.Z., Ekoé J.M., Rewers M., Williams R. (eds.). *The epidemiology of diabetes mellitus*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, Chippenham, UK, pp. 11-30.
54. Escott K.J., Beech J.S., Haga K.K., Williams S.C., Meldrum B.S. y Bath P.M. 1998. Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole and 7-nitro indazole. After transient focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 18:3:281-287.
55. Fischmann T.O., Hruza A., Niu X.D., Fossetta J.D., Lunn C.A., Dolphin E., Prongay A.J., Reichert P., Lundell D.J., Narula S.K., Weber P.C. 1999. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature Structural and Molecular biology*. 6: 233–242
56. Forstermann U., Boissel J.P. and Kleinert H. 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB Journal*. 12: 773–790
57. Geller D.A. and Billiar T. R. 1998. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Review*. 17: 7–23
58. Ghosh, D.K., Abu-Soud H.M. and Stuehr D.J. 1995. Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase. *Biochemistry*. 34: 11316–11320
59. Gómez P.J., Aguilar S.C., Rull R.J. 2004. Clasificación y diagnóstico de la diabetes. En: Gómez FJ, Aguilar CA. (eds.), *Diabetes actualidades terapéuticas*. Medicina & Mercadotecnia, México, pp. 1-11.
60. González-Zulueta M., Feldman A.B., Klesse L.J., Kalb R.G., Dillman J.F., Parada L.F., Dawson T.M. y Dawson V.L. 2000. Requirement for nitric oxide activation of p21ras/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97:1:436-441.

61. Gorelick P.B., Wong K.S., Hee-Joon B., Pandey D.K. 2008. Large Artery Intracranial Occlusive Disease: A Large Worldwide Burden but a Relatively Neglected Frontier. *Stroke*. 39: 2396 - 2399.
62. Grant S.K., Green B.G., Stiffey-Wilusz J., Durette P.L., Shah S.K. and Kozarich J.W. 1998. Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry*. 37: 4174–4180
63. Graybiel A.M. 2005. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Current Opinions in Neurobiology*. 15:638-644.
64. Griess P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*. 12: 426–428.
65. Gustavsson M., Anderson M.F., Mallard C. y Hagberg H. 2005. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats. *Pediatric Research*. 57:2:305-309.
66. Harris M.I. 2004. Definition and classification of diabetes mellitus and the criteria for diagnosis. En: LeRoith D., Taylor S., Olefsky J.M. (eds.), *Diabetes mellitus a fundamental and clinical text*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 458-467
67. Herreras O. y Somjen G.G. 1993 Propagation of spreading depression among dendrites and somata of the same cell population. *Brain Research*. 610:276-282.
68. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C. y Lazdunski M. 1995. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92:4666-4670.
69. Hobbs A.J., Fukuto J.M. and Ignarro L.J. 1994. Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91: 10992–10996.
70. Hossmann K.A. 1993. Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation* 26:225-235.

71. Iadecola C. 1998. Cerebral circulatory dysregulation in ischemia in Cerebrovascular diseases (Ginsberg M.D. and Bogoussiavsky J. ed.) Blackwell, Cambridge, MA 319-332.
72. Iadecola C. 1999. Mechanisms of cerebral ischemic damage in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology (Walz W. ed) Human Press Totowa, NJ 1:3-32.
73. Irwin A. y Walz W. 1999. Spreading depression waves as mediators of secondary injury and of protective mechanisms in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology (Walz W. ed) Human Press Totowa, NJ 2:35-44.
74. Janssens, S.P., Shimouchi A., Quertermous T., Bloch D.B. and Bloch K.D. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. Journal of Biological Chemistry. 267, 14519-14522.
75. Jiang C., Sigworth F.J. y Haddad G.G. 1994. Oxygen deprivation activates an ATP- inhibitable K⁺ channel in substantia nigra neurons. Journal of Neurosciences. 14:5590-5602.
76. Juurlink B.H. y Sweeney M.I. 1997. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 21:2:121-128.
77. Kan H., Xie Z., Finkel M.S. 1999. TNF- α enhances cardiac myocyte NO production through MAP kinase-mediated NF- κ B activation. American Journal of Physiology. 276: H1641-H1646.
78. Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T.M. 1991. Principles of neural science 3rd ed Elsevier Science Publishing Co. NY.
79. Kinnier Wilson S.A. 1914. "An experimental research into the anatomy of the *corpus striatum*". Brain. 36 (3-4): 427-492.
80. Kirino T. 2002. Ischemic tolerance. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 22:11:1283-1296.
81. Kitagawa K., Matsumoto M., Kuwabara K., Tagaya M., Ohtsuki T., Hata R., Ueda H., Handa N., Kimura K. y Kamada T. 1991. "Ischemic tolerance" phenomenon detected in various brain regions. Brain Research. 561:203-211.

82. Klatt P., Schmidt K., Lehner D., Glatter O., Bachinger H.P. and Mayer B. 1995. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO Journal*. 14: 3687–3695
83. Knowles R.G. Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemistry Journal*. 298, 249–258
84. Kraig R.P. y Nicholson C. 1978. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3:1045-1059.
85. Latarjet M. 2004. Tratado de anatomía humana Tomo I. Editorial Medica Panamericana; 4ª edition, pp. 612-625.
86. Lauritzen I., De Weille J.R. y Lazdunski M. 1997. The potassium channel opener (-) cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*. 69:4:1570-1579.
87. Lee J.M., Zipfel G.J. y Choi D.W. 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*. 399 (Supp.) A7-A14.
88. Lipton E. 1999 Ischemic cell death in brain neurons. *Physiology Reviews*. 79:1431-1568.
89. Liu Y., Ytrehus K. y Downey J.M. 1994. Evidence that traslocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26:661-668.
90. Lothman E., LaManna J., Cordingley G., Rosenthal M. y Somjen G.G. 1975. Responses of electrical potential, potassium levels and oxidative metabolism in cat cerebral cortex. *Brain Research*. 88:15-36.
91. Makita Z., Yanagisawa K., Kuwajima S., y col. 1995. "Advanced glycation end-products and diabetic nephropathy.". *Journal of Diabetes Complications*. 9(4): 265-8.
92. Marletta M.A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 78, 927–930
93. Marsden P.A., Schappert K.T., Chen H.S., Flowers M., Sundell C.L., Wilcox, J.N., Lamas S. and Michel T. 1992. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*. 307:287–293

94. McCall T.B., Feelisch M., Palmer R.M. and Moncada S. 1991. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *British Journal of Pharmacology*. 102: 234–238
95. McLlwain H. 1996. Preparing neural tissues for metabolic study in isolation. *Practical Neurochemistry*. Churchill Livingstone, London, pp. 105 - 132.
96. McLaughlin B.A., Hartnett K.A., Erhardt J.A., y col. 2003. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 100:715-720.
97. McMillan K. and Masters B.S. 1995. Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry*. 34: 3686–3693.
98. McNeill J.H. *Experimental Models of Diabetes*. 1999. Illustrated. Boca Raton, Fla., CRC Press 418 pp.
99. Michaelis E.K. 1998 Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*. 54:369-415.
100. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 5(1): 62 - 71. 30.
101. Misko T.P., Moore W.M., Kasten T.P., Nickols G. A., Corbett J.A., Tilton R.G., McDaniel M.L., Williamson J.R. and Currie M.G. 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *European Journal of Pharmacology* 233: 119–125
102. Mochly-Ronsen D. y Gordon A.S. 1998. Anchoring proteins kinase C: a means for isoenzyme selectivity. *FASEB Journal*. 12:35-42.
103. Mokhtar Y. 1990 Cerebrovascular disease and risk of stroke. Sitio web. http://www.thedoctorslounge.net/medlounge/articles/stroke_risk/strokerisk1.htm
104. Muñoz T.A. (2001) Participación de los canales de potasio sensibles al ATP en procesos de acondicionamiento isquémico en neuronas de hipocampo de ratón. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México.

105. Murry C. E., Jennings R. B. y Reimer K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 74: 1124-1236.
106. Nader-Kawachi J, Góngora-Rivera F., Santos-Zambrano J., Calzada P., Ríos C. 2007. Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: a pilot study. *Neurological Research*. 29(3):331-4.
107. Nakane M., Teraoka A., Asato R., Tamura A. 1992. Degeneration of the ipsilateral substantia nigra following cerebral infarction in the striatum. *Stroke*. 23: 328 - 332.
108. Nathal E., Miquela J.M., Herreman F., Alvarado R. y Romero V. (1993) Antagonistas del receptor NMDA en isquemia cerebral focal. *Gaceta Médica Mexicana*. 129 (2):125-130.
109. Nathan C., Xie Q.W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78, 915–918
110. National Institute of Neurological Disorders and Stroke.1990. Classification of cerebrovascular disease III. *Stroke* 21: 637-741.
111. Nedergaard M., Gjedde A. y Diemer N.H. 1986. Focal ischemia of the rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 6:414-424.
112. Nishida C.R., Ortiz de Montellano P.R. 1999. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 14692–14698
113. Nishizawa Y. 2001. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences*. 69 (4):369-381.
114. Ohno M. y Watanabes S. 1996. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats. *Brain Research Bulletin*. 40:229-236.
115. Olaz G., Rivera J., Shamah T., Rojas R, Villalpando S, Hernández M, Sepúlveda J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. SSA-INSP, México.
116. Packard M.G., Knowlton B.J. 2002. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Reviews on Neurosciences*. 25:563-593.

117. Pagliaro P., Gattullo D., Rastaldo R. y Losano G. 2000. Ischemic preconditioning from the first to the second window of protection. *Life Sciences*. 69 (1):1-15.
118. Phillips J.M. y Nicholson C. 1979. Anion permeability in spreading depression investigated with ion sensitive microelectrodes. *Brain Research*. 173:567-571.
119. Pickup J.C., Williams G. 2003. History of diabetes. En: Pickup J.C., Williams G. (eds.), *Textbook of diabetes*. 3rd ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, vol. 1, pp. 1.1-1.16
120. Planas A.M. 1997. Alteraciones de la membrana celular y de la síntesis de proteínas en modelos experimentales de isquemia cerebral: implicaciones farmacológicas para el tratamiento de la patología isquémica. *Revista de Neurología*. 12:9:405-417.
121. Pong K. 2004. Ischemic preconditioning: therapeutic implications for stroke? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 8 (2):1-15.
122. Raffan Sanabria F. y Kling Gómez J.C. 2000. Síndrome de reperfusión: Fisiopatología, prevención y manejo. *Revista Colombiana de Anestesiología*. 28(4): 38-43.
123. Ramji D.P., Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochemistry Journal*. 365:561-575.
124. Reimer K.A., Hill M.L. y Jennings R.B. 1981. Prolonged depletion of ATP and adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 13:229-239.
125. Riepe M.W. y Ludolph A.C. 1997. Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 174:249-254.
126. Riepe M.W., Esclaire F., Kasischke K., Schreiber S., Nakase H., Kempinski O., Ludolph A.C., Dirnagl U. y Hugon J. 1997. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 17:3:257-264.

127. Riksen N.P., Smits P. y Rongen G.A. 2004. Ischaemic preconditioning: from molecular characterization to clinical application – part I. *Netherlands Journal of Medicine*. 62(10):353-363.
128. Ríos C., Nader-Kawachi J., Rodríguez-Payán A.J., Nava-Ruiz C.. 2004. Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats. *Brain Research*. 999(2):212-5.
129. Robbins S.L., Kumar V. y Cotran R.S. 2000. *Patología Humana. El Sistema Nervioso Central* Mc Graw-Hill 6ª edición 30:1353-1357.
130. Rodríguez E., Méndez-Armenta M., Villeda-Hernández J., Galván-Arzate S., Barroso-Moguel R., Rodríguez F., Ríos C., Santamaría A. 1999. Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat *corpus striatum*. *Toxicology*. 139(1-2):111-8.
131. Rodríguez S.J. 2002. Clasificación y Criterios diagnósticos de la diabetes mellitus. En: Robles-Valdés C, Díaz-Salazar J, Rodríguez-Saldaña J, Lavalle-González F. (eds.), *Control total de la diabetes para el médico tratante*. Federación Mexicana de Diabetes, México, pp. 1-11.
132. Rosell A., Giménez-Amaya J.M. 1999. Anatomical re-evaluation of the corticostriatal projections to the caudate nucleus: a retrograde labeling study in the cat. *Neuroscience Research*. 34 (4): 257–69.
133. Salerno J.C., Harris D.E., Irizarry K., Patel B., Morales A.J., Smith S.M., Martasek P., Roman L.J., Masters B.S., Jones C.L. y col. 1997. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 29769–29777
134. Samdani A.F., Dawson T.M. y Dawson V.L. 1997. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28:6:1283-1288.
135. Santolini J., Adak S., Curran C.M. and Stuehr D.J. 2001. A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 1233–1243.
136. Schmidt H., Hofmann H., Schindler U., Shutenko Z.S., Cunningham D.D. and Feelisch M. 1996. No NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 14492–14497

137. Schmidt-Kastner R., Fliss H., Hakim A.M., Ginsberg M. Subtle Neuronal Death in Striatum After Short Forebrain Ischemia in Rats Detected by In Situ End-Labeling for DNA Damage. *Stroke*, Jan 1997; 28: 163 - 170.
138. Schultz W., Dayan P., Montague R.R. 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275: 1593-1599.
139. Schultz W., Romo R. 1992. Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements: I. Preparatory activity in the anterior striatum. *Experimental Brain Research*. 91: 363-384.
140. Shang H.Q. y Cheng J.S. 2000. Effect of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel during hypoxia in rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*. 286:45-48.
141. Sharp F.R., Ran R., Lu A., Tang Y., Strauss K.I., Glass T., Ardizzone T. y Bernaudin M. 2004. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *Neurotherapeutics* 1:1:26-35.
142. Sheta, E. A., McMillan, K. and Masters, B. S. 1994. Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. *J. Biological Chemistry*. 269: 15147-15153
143. Simon R.P., Swan J.H., Griggths T. y Meldrum B.S. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226:859-862.
144. SINAIS. 2007. Estadísticas de mortalidad. Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. Pagina web: <http://sinais.salud.gob.mx/>
145. Singh K., Balligand J., Fischer T.A., Smith T., Kelly R. 1996. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 271(2): 1111-1117.
146. Somjen G.G., Aitken P.G., Czeh C.L., Herreras O., Jing J. y Young J.N. 1992. Mechanisms of spreading depression. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 70:5248-5254.

147. Song D., Yao R., Pang C.C. 2008. Altered vasodilator role of nitric oxide synthase in the pancreas, heart and brain of rats with spontaneous type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology*. 591(1-3): 177-81.
148. Stamler J.S., Single D., Loscalzo J. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science*. 258:1898-1892.
149. Standring, S. 2008. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice* [Hardcover]. Churchill Livingstone; 40 edition, pp. 325-335.
150. Stuehr D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L. and Wiseman J. 1991. Nomega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 6259–6263
151. Sweeney M.I. 1997. Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia: window of opportunity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21:207-217.
152. Sweeney M.I., Yager J.Y., Walz W. y Juurlink H.J. 1995. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 73:1525-1535.
153. Tanaka H., Yokota H., Jover T., Cappuccio I., Calderone A., Simionescu M., Bennett M. y Zukin R.S. 2004. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *Journal of Neurosciences*. 24 (11):2750-2759.
154. Tanaka K. 2001. Alteration of second messengers during acute cerebral ischemia – adenylyl cyclase, cyclic AMP-dependent protein kinase, and cyclic AMP response element binding protein. *Progress in Neurobiology*. 65:173-207.
155. Tanaka R., Yamashiro K., Mochizuki H., Cho N., Onodera M., Mizuno Y., Urabe T. 2004. Neurogenesis After Transient Global Ischemia in the Adult Hippocampus Visualized by Improved Retroviral Vector. *Stroke*. 35: 1454 - 1459.
156. *The Merck Manual of Diagnostic and Therapy*. 2005. Neurologic disorders. Cerebrovascular disease: Ischemic Syndromes. 17th edition Merck & Co., Sección 14, capítulo 174. <http://www.merck.com>.

157. Thornton J.D., Liu G.S., Olsson R.A. y Downey J.M. 1992. Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation*. 85:659-665.
158. Tymianski M., Wallace M.C., Spigelamn I., Uno M., Carlen P.L., Tator C.H. y Charlton M.P. 1993. Cell-permeant Ca²⁺ chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury *in vitro* and *in vivo*. *Neuron*.11:221-235.
159. Uetrecht J.P. 1995. "Myeloperoxidase as a generator of drug free radicals". *Biochemistry Society Symposium*. 61: 163–70.
160. Walker F.O. 2007. Huntington's disease. *The Lancet*. 369(9557): 218–28.
161. Weinberger J. 2000. Contemporary diagnosis and management of stroke. 2nd ed. Handbooks in Health Care Co., Newtown Pennsylvania, USA.
162. Weiss S. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine*. 320:365-392.
163. Werner E.R., Pitters E., Schmidt K., Wachter H., Werner-Felmayer G. and Mayer B. 1996. Identification of the 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin as a dihydropteridine reductase inhibitor and a potent pteridine antagonist of rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry Journal*. 320: 193–196
164. White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A. y Krause G.S. 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of Neurological Sciences*. 179:1-33.
165. WHO (World Health Organization). 2008. Diabetes Programme. <http://www.who.int/diabetes/en/>
166. WHO-IDF, 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. WHO, Geneva, Suiza. Disponible en línea: <http://www.who.int/diabetes/en/>
167. Wolff D.J. and Lubeskie A. 1995. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 316: 290–301
168. Wolff D.J., Datto G.A., Samatovicz R.A. and Tempstick, R.A. 1993. Calmodulin-dependent nitric-oxide synthase. Mechanism of inhibition by

- imidazole and phenylimidazoles. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 9425–9429
169. Wolff D.J., Lubeskie A., Gauld D.S. and Neulander M.J. 1998. Inactivation of nitric oxide synthases and cellular nitric oxide formation by N6-iminoethyl-L-lysine and N5-iminoethyl-L-ornithine. *European Journal of Pharmacology*. 350: 325–334
170. Xia Y., Dawson V.L., Zinder S.H., Sweier J.L., 1996. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93:6770-6774.
171. Xuan Y.T., Tang X.L., Banerjee S., y col. 1999. Nuclear factor kappa B plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in rabbits. *Circulation Research*. Vol.84, pp.1095-1109.
172. Yellon D.M. y Baxter G.F. 1995. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27(4):1023-1034.
173. Yellon D.M. y Dana A. 2000. The preconditioning phenomenon. *Circulation Research*. 87:543- 550.
174. Yelnik J., Francois C., Percheron G. 1997. Spatial relationships between striatal axonal endings and pallidal neurons in macaque monkeys. *Advances in Neurology*. 1997;74:45-56
175. Yeterian E.H., Pandya, D.N. 1995. Corticostriatal connections of extrastriate visual areas in rhesus monkeys. *The Journal of Comparative Neurology* 352(3):436-457.
176. Zimmerman G.A., Meistrell 3rd, Bloom O., y col. 1995. Neurotoxicity of advanced glycation of end-products during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92(9):3744-8.

ANEXOS

ABREVIATURAS

Ado, adenosina; **ADP**, difosfato de adenosina; **AMPA**, α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-ácido propiónico; **AMPc**, monofosfato de adenosina cíclico; **ATP**, trifosfato de adenosina; **AVC**, accidente vascular cerebral; **Ca²⁺**, calcio; **canales K_{ATP}**, canales de potasio sensibles al ATP; **CII**, infarto isquémico cerebral; **DAG**, diacilglicerol; **eNOS**, sintetasa de óxido nítrico endotelial; **EVC**, enfermedad vascular cerebral; **FLC**, fosfolipasa C; **FLD**, fosfolipasa D, **FSC**, flujo sanguíneo cerebral; **GABA**, ácido gamma-amino-butírico; **GTP**, trifosfato de guanosina; **H⁺**, hidrógeno; **HIF**, factor inducible de hipoxia; **HSPs**, proteínas heat shock; **ILs**, interleucinas; **iNOS**, sintetasa de óxido nítrico inmunitario inducible; **K⁺**, potasio; **MAPK**, proteína cinasa activada por mitógenos; **Na⁺**, sodio; **NF- κ B**, factor nuclear kappa B; **NMDA**, N-metil-D-aspartato; **nNOS**, sintetasa de óxido nítrico neuronal; **NO**, óxido nítrico; **NOS**, sintetasa de óxido nítrico; **O₂⁺**, superóxido; **OGD**, privación de oxígeno/glucosa; **ONOO⁻**, peroxinitrato; **PAF**, factor de activación plaquetario; **PI**, preconditionamiento isquémico; **PKC**, proteína cinasa C; **PG**, proteína G; **R**, receptor; **R-Ado**, receptor a adenosina; **ROS**, especies reactivas de oxígeno; **SD**, depresión expansiva; **SNC**, sistema nervioso central; **SOD**, superóxido dismutasa; **TIA**, ataque isquémico transitorio; **TK**, tirosina cinasa; **VEGF**, factor de crecimiento del endotelio vascular.

GLOSARIO.

Adenosina. Compuesto derivado del ácido nucleico, constituido por adenina y un azúcar, la D-ribosa; es componente molecular fundamental de AMP, ADP, ATP, ADN, ARN.

Aerobio. Organismo que sólo puede vivir en un medio con oxígeno, utilizando el mecanismo de respiración aerobio. Se aplica al ser vivo que necesita del oxígeno molecular para subsistir.

Afasia. Defecto o pérdida de lenguaje como consecuencia de una lesión neurológica.

Agonista. Aquella sustancia que es capaz de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula.

Amaurosis. Pérdida de la capacidad visual por afectación del nervio óptico, la retina o el cerebro.

Antagonista. Sustancia que es capaz de unirse a un receptor y no solamente lo activa sino en realidad bloquea su activación por los agonistas.

Antioxidante. Conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. Impide la oxidación perjudicial de otras sustancias químicas, ocasionada en las reacciones metabólicas o producido por los factores exógenos como las radiaciones ionizantes.

Ataxia. Deficiencia de coordinación motora como consecuencia de una falta de sensibilidad profunda consciente (ataxia espinal) o del sistema cerebeloso (ataxia cerebelosa).

Autorregulación. Se refiere a los diversos mecanismos miógenos, neurógenos y metabólicos de que dispone la circulación cerebral para mantener constante el flujo sanguíneo a pesar de las variaciones de la presión arterial sistémica.

Cateterismo. Introducción de una sonda en un órgano o cavidad corporal para inyectar o extraer un líquido.

Concéntrica. Se dice de las figuras y de los sólidos que tienen un mismo centro.

Disfagia. Dificultad para deglutir o tragar alimentos, provocada por la obstrucción mecánica del esófago (tumores, cuerpo extraño, esofagitis, etc.) o por trastornos motores de la faringe o del esófago, que impiden propulsar adecuadamente el bolo alimenticio por el esófago.

Dislexia. Alteración de la capacidad para leer el lenguaje escrito, como resultado de un trastorno del sistema nervioso central.

Enfermedad vascular cerebral. Trastorno que afecta a los vasos sanguíneos en el cerebro.

Excitotoxicidad. Término acuñado por Olney para describir situaciones resultantes de la activación excesiva de los receptores de glutamato, lo cual conduce a lesión o muerte neuronal.

Glutamato. Forma ionizada del ácido glutámico, un aminoácido que actúa como principal neurotransmisor excitador del SNC.

Hemorragia. Pérdida de una gran cantidad de sangre en un periodo de tiempo corto, bien sea externa o interna.

Hidrólisis. Descomposición química de un compuesto por acción del agua en productos más simples. La descomposición de compuestos orgánicos por la interacción del agua.

Hiperemia. Abundancia extraordinaria de sangre en una parte del cuerpo.

Hipotermia. Descenso de la temperatura del cuerpo por debajo de lo normal.

Homeostasis. Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en las composiciones y las propiedades del medio interno de un organismo.

Ictus. Ataque.

Isoforma. Se aplica a un cuerpo que posee igual forma cristalina y diferente composición química.

Isquemia. Suministro insuficiente de sangre a un órgano o una zona del organismo, debido a la obstrucción o constricción de un vaso sanguíneo.

Metabolismo. Conjunto de procesos biológicos mediante los cuáles los organismos incorporan a su propia materia viva sustancias diversas que toman del medio ambiente.

Monofosfato de adenosina cíclico. Segundo mensajero en la acción de muchas hormonas, como catecolaminas, péptidos y glucoproteínas. Actúan como mediador de los efectos de estas hormonas en sus células efectoras.

Necrosis. Tipo de muerte patológica de las células, debido a enfermedad, lesión o falta de suministro sanguíneo, lo cuál ocasiona que muchas células adyacentes se hinchen, estallen y derramen sus contenidos hacia el líquido intersticial, con lo que se activa la respuesta inflamatoria.

Neurotransmisor. Diversas moléculas que se encuentran dentro de las terminales axónicas y se liberan hacia la hendidura sináptica en respuesta a un impulso nervioso; tienen efecto en el potencial de membrana de la neurona post-sináptica.

Óxido Nítrico. Gas que actúa como neurotransmisor tanto en el SNC como en neuronas autónomas periféricas y que es un regulador autocrino y paracrino en muchos órganos.

Penumbra. Región periférica del territorio isquémico en el cuál la reducción del flujo sanguíneo es menos severa, y su relativo mantenimiento de perfusión se debe al flujo

sanguíneo colateral originado en el territorio adyacente no isquémico.

Plasticidad. Propiedad de algunas sustancias de alterar su forma por débiles tensiones o presiones, persistiendo la nueva forma.

Precondicionamiento. Acción y efecto de disponer una cosa para un determinado fin previo a que este suceda

Redox. Término abreviado para las reacciones de reducción-oxidación. Reacciones redox son una serie de reacciones de sustancias en las cuáles la transferencia de electrones tiene lugar. La sustancia que gana electrones es llamada agente oxidante.

Soplo. Sonido anormal de tono bajo similar a un murmullo.

Tinnitus. Sensación auditiva anormal percibida, la mayoría de las veces, por el propio sujeto

(acúfeno subjetivo) o, más raramente, por otro (acúfeno objetivo). Pueden percibirse de manera difusa en la cabeza o unilateralmente en un oído. Algunos son sincrónicos con el pulso y son sospechosos de una patología vascular.

Transcripción. Primer paso en la transferencia de información genética, en la que un sólo filamento de ADN sirve de plantilla para la formación de una molécula de ARN.

Transducción. Síntesis de una nueva proteína en un ribosoma, de acuerdo con la secuencia de codones de una molécula de ARN mensajero.

Transición. Acción y efecto de pasar de un modo de ser a otro, de una etapa a otra o de un razonamiento a otro.

Trifosfato de adenosina. Molécula portadora de energía que elaboran todas las células vivas para captar y almacenar energía.

Viabilidad. Que puede vivir. Se aplica al objeto u asunto que por sus circunstancias tiene probabilidades de poder llevarse a cabo.

Viscosidad. Propiedad que tienen los fluidos de ofrecer resistencia a los cambios de forma, y en particular al deslizamiento, por acciones internas moleculares.

Vulnerabilidad. Grado en el que un individuo puede ser propenso a desarrollar un trastorno bajo la acción de determinados estresores ambientales.