

EFFECTO DE LA HEPARINA, EL MAGNESIO Y LA VITAMINA E SOBRE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR ISQUEMIA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY

* Alvarado-Tapias, E.A.; * Rivas-Coppola, M.S.; * Vásquez-Pérez, A.V.; * Torres-Peraza, J. F.; * Vélchez-Pineda, D.; * Bravo-Tobar, I. D.; * Bonfante-Cabarcas, R. A.

PALABRAS CLAVE: Heparina. Magnesio. Vitamina E. Neurotoxicidad. Isquemia. Motilidad.

RESUMEN

La morbimortalidad por accidentes cerebro vasculares representan un problema de salud pública en Venezuela. Se ha postulado que durante los períodos de hipoxia: la producción de radicales libres, la entrada masiva de calcio, la activación de los receptores NMDA y la producción de un fragmento neurotóxico de 22 kDa a través de la acción de la trombina sobre la apolipoproteína E están involucrados en la neurotoxicidad. En el presente trabajo evaluamos clínicamente el efecto del Mg^{2+} , la heparina, las vitaminas E y C sobre la morbi-mortalidad en ratas Sprague Dwaley sometidas a isquemia cerebral global por ligadura y corte de ambas arterias carótidas. La muestra estuvo constituida por 40 animales, divididas en 5 grupos: Control-Control, Control-Fisiológica, magnesio, vitamina E y heparina, aplicando un protocolo doble ciego. Bajo anestesia general los animales fueron sometidos a ligadura, corte, canulación e infusión de los fármacos experimentales en la carótida común izquierda, y ligadura y corte de la carótida común derecha. Por las cánulas se administró solución fisiológica, $MgCl_2$ en solución fisiológica y heparina. Las vitaminas E y vitamina C se administraron vía oral 6 días en el pre-operatoria. Se realizaron evaluaciones motoras y conductuales pre-operatorias y post-operatorias. Se observó la más alta mortalidad en el grupo Control-Control y el menor porcentaje fue observado en el grupo Control-Fisiológica y heparina. El grupo heparina presentó el mayor promedio de motilidad y el mayor promedio de conducta exploratoria. El grupo magnesio presentó el menor promedio de ptosis palpebral y el menor promedio de trastornos motores. A su vez el grupo vitamina E presentó el mayor período de sobrevivida post-operatoria. En conclusión la heparina, el magnesio y la vitamina E previenen la neurotoxicidad disminuyendo la mortalidad y la morbilidad.

HEPARIN, MAGNESIUM AND VITAMIN E EFFECT ON NEUROTOXICITY INDUCE BY ISCHEMIC IN SPRAGUE DAWLEY RATS

KEY WORDS: Heparin. Magnesium. Vitamin E. Neurotoxicity. Ischemia. Motility.

ABSTRACT

The morbidity and mortality from strokes represent a public health problem in Venezuela. It is postulated that during periods of hypoxia: the production of free radicals, massive calcium influx, activation of the NMDA receptors and the production of 22 kDa neurotoxic fragment from the action of thrombin on apolipoprotein E are involved in the neurotoxicity. In this study we clinically evaluated the effect of Mg^{2+} , heparin, vitamins E and C on morbidity and mortality of adult male Sprague Dawley subjected to global cerebral ischemia by ligation and cut of both carotid arteries. The sample consisted of 40 animals, divided into 5 groups: Control-Control, Control-Vehicle, magnesium, vitamin E/C and heparin, using a double-blind protocol. Under general anesthesia the animals underwent ligation, cut, cannulation and infusion of experimental drugs into the left common carotid artery, and ligation and cut of the right common carotid. Through the cannulas were administered saline, $MgCl_2$ saline and heparin. Vitamins E and vitamin C were administered orally 6 days in the pre-operative period. Pre-operative and post-operative motor and behavioral assessments were performed. The highest mortality was observed in the Control-Control group and the lowest percentage was observed in the Control-Vehicle and heparin groups. The heparin group had the highest average in motility and in rearing behavior. The magnesium group had the lowest average in ptosis and motor disorders. In turn, the vitamin E/C the highest post-surgical survival. In conclusion heparin, magnesium and vitamin E prevent neurotoxicity decreasing mortality and/or morbidity.

* Unidad de Bioquímica. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto 3001, estado Lara. Venezuela.

Autor de Correspondencia: Dr. Rafael Armando Bonfante Cabarcas. Unidad de Bioquímica. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado". Av. Libertador con Av. Andrés Bello, detrás del Hospital Pediátrico. Barquisimeto 3001, estado Lara. Venezuela. Teléfono: 58-251-2591854

Email: rcabarca@ucla.edu.ve

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular o accidente cerebrovascular (ACV) es la interrupción del flujo sanguíneo a cualquier parte del cerebro, describiéndose tres tipos de ellos, el tipo isquémico el cual es considerado el más frecuente, seguido del hemorrágico, y el debido a otras causas ⁽¹⁾. La interrupción del flujo sanguíneo restringe el suministro de sustratos, particularmente de oxígeno y glucosa, lo que modifica la energética celular requerida para mantener los gradientes iónicos neuronales, también genera pérdida del potencial de membrana y de la despolarización de los nervios ⁽²⁾.

Recientemente importantes avances han sido logrados en el conocimiento de los fenómenos que inducen el daño neuronal, en primer lugar, se ha planteado el mecanismo de neurotoxicidad mediada por la liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios, dentro de los cuales destaca el glutamato, el cual actúa a través de la activación de receptores ionotrópicos post-sinápticos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) ⁽³⁾, de los cuales el mejor estudiado en relación con los fenómenos neurodegenerativos es el receptor NMDA, cuya sobreactivación genera desequilibrio iónico dentro de la célula que conlleva a la disfunción neuronal ⁽⁴⁾. Al aumentar la estimulación glutamatérgica, se produce un incremento intraneuronal de Ca^{2+} proveniente de la activación de los receptores NMDA permeables a Ca^{2+} ⁽⁵⁾. La despolarización sostenida inducida por glutamato y la dependiente de sodio, activa los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo cual incrementa aun más los niveles de Ca^{2+} intracelular, adicionalmente, el Ca^{2+} intracelular induce la liberación de calcio de las reservas intracelulares ⁽⁶⁾. Este masivo incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intraneuronal, desencadena varios mecanismos neurodegenerativos a nivel citoplasmático y nuclear que incluyen la activación de vías apoptóticas intrínsecas ⁽⁷⁾ y de mecanismos que generan radicales libres mediado por la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa que produce incremento en la síntesis y liberación de óxido nítrico (ON), el cual potencia la liberación del glutamato ⁽⁸⁾ y de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) produciendo la liberación de ácido araquidónico (AA), el cual a través de la vía de la lipoxigenasa genera O_2^- ⁽⁹⁾.

En condiciones normales el sistema nervioso central (SNC) utiliza al O_2 como principal fuente de energía a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial para la producción de ATP, molécula energética capaz de mantener los gradientes iónicos transmembrana a través de la ATPasa Na^+/K^+ y de reducir el O_2 a H_2O ⁽¹⁰⁾. Durante los estados de hipoxia o anoxia, se reduce considerablemente la producción de ATP, la disminución del ATP y la elevación consecutiva del AMP favorecen la liberación de iones de Fe^{2+} , principales promotores de la reacción de fenton que incrementa la producción de $\cdot\text{OH}$ a partir del H_2O_2 ⁽¹¹⁾, así como la por activación del factor de transcripción factor-1 inducible por hipoxia, el cual modifica la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones ⁽¹²⁾. Paralelamente la enzima xantina deshidrogenasa es convertida en xantina oxidasa por la peptidasa calpaína ⁽¹³⁾, la cual incrementa la síntesis de O_2^- principalmente en la pared vascular ⁽¹⁴⁾. La alta toxicidad de las especies reactivas del oxígeno produce el daño neuronal a través del ataque a proteínas, ácidos desoxirribonucleicos y de la hidroxilación de los lípidos de la membrana ⁽¹⁵⁾. La disrupción de la membrana neuronal aumenta la permeabilidad transmembrana al agua e iones conllevando a la muerte celular por fenómenos osmóticos ⁽¹⁶⁾.

Por otro lado, la trombina es una serina proteasa multifuncional activada durante la cascada de la coagulación, que actualmente ha sido involucrada en los mecanismos de neuroprotección durante disfunción endotelial o trauma cerebral ⁽¹⁷⁾. Sin embargo, ha sido demostrado que la infusión directa de altas concentraciones de trombina dentro del cerebro genera infiltrado celular inflamatorio, formación de edema cerebral y muerte neuronal ⁽¹⁸⁾. La acción de la trombina una vez activada es bifásica, a bajas concentraciones, actúa a través de la activación del receptor PAR-1 y produce la liberación de la endotelina-1, un potente vasoconstrictor ⁽¹⁹⁾, adicionalmente, incrementa la síntesis y liberación del factor de crecimiento neuronal ⁽²⁰⁾, promueve la mitosis en los astrocitos y protege tanto a los astrocitos como neuronas de la muerte inducida durante el estrés oxidativo ⁽²¹⁾. A altas concentraciones actúa a través de la activación del receptor PAR-1 y conjuntamente con la plasmina incrementa la permeabilidad capilar contribuyendo al deterioro de la barrera hematoencefálica ⁽²²⁾. Esto permite la entrada de proteínas de alto peso

molecular al SNC, como por ejemplo la apolipoproteína E, la cual por acción de la trombina genera un péptido de 22 kDa con efectos neurotóxicos debido a la activación del proceso de apoptosis⁽²³⁾. Este péptido ha sido postulado como fuente de toxicidad en la enfermedad de Alzheimer⁽²⁴⁾, sin embargo; su acción en los procesos isquémicos cerebrales es desconocida. La activación de la trombina es modulada por la proteasa Nexin-1, la cual produce su inhibición⁽²⁵⁾. Estudios realizados durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer han demostrado una significativa disminución en la concentración de la proteasa Nexin-1⁽²⁶⁾.

Tomando en cuenta los mecanismos neurotóxicos planteados previamente, se desarrolló el presente trabajo en un modelo animal de isquemia global y se observó el efecto del magnesio, la vitamina E y la heparina, basados en la hipótesis de que cada uno de estos fármacos es capaz de intervenir y modificar la evolución del daño por isquemia en la rata, al modular una ruta patogénica en particular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tratamientos

Los experimentos fueron realizados con 40 ratas albinas macho de la cepa Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) de 2 meses de edad. De acuerdo al tratamiento recibido la muestra fue subdividida en 5 grupos: a) Control-Control, b) Control-Fisiológica, c) vitamina E, d) cloruro de magnesio ($MgCl_2$), e) heparina. Las ratas fueron colocadas en jaulas individuales con libre acceso al agua y comida; con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, los experimentos fueron realizados durante el ciclo de luz.

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Decanato de Ciencias de la Salud de la UCLA. Se realizó un protocolo experimental doble ciego, la identidad de las ratas fue conocida únicamente por un testigo externo quien colocó la clave en un sobre sellado. El testigo fue encargado de preparar las soluciones para los tratamientos farmacológicos, colocarlos en envases no diferenciables, codificarlos con la identificación numérica de la rata y entregárselo a los experimentadores.

Protocolo Quirúrgico

Bajo anestesia general inducida con pentobarbital sódico 50 mg/kg y atropina 1 μ mol/kg

administrados por vía intraperitoneal, se procedió a ligar y cortar una de las arterias carótidas comunes, a los 5 minutos se canuló la carótida contralateral y se procedió a administrar el tratamiento correspondiente, finalmente se retiró la cánula y la arteria contralateral fue ligada y cortada.

Tratamiento preoperatorio

Las ratas pertenecientes al grupo vitamina E recibieron durante 6 días antes de la operación 30 cc diarios de una solución que contenía vitamina E (0,013mg/mL)/vitamina C (13,3 mg/mL) disueltos en un vehículo de polietilenglicol al 0,2% y sacarosa al 20%. Las ratas pertenecientes a los grupos Control-Control, Control-Fisiológica, magnesio y heparina recibieron solamente el vehículo.

Tratamiento intra-operatorio.

Fue administrado a través de la cánula intrarterial a una velocidad de 0,05 cc/min. A las ratas del grupo magnesio se les administró 1cc de $MgCl_2$ (10 mM) disuelto en solución fisiológica, al grupo heparina 1cc de heparina (100 U/ml) disuelto en solución fisiológica y a los grupos Control-Fisiológica y vitamina E, se le administró 1cc de solución fisiológica.

Motilidad

La motilidad fue medida en cajas de madera individuales de 60x60x30 cm, divididos en 4 compartimientos iguales por 2 tabiques en forma de cruz que se comunican por puertas en forma de arco de 12,5x7cm. Los ensayos fueron realizados durante los periodos pre-operatorios y post-operatorio. En el periodo pre-operatorio se realizaron 5 sesiones, en los días consecutivos previos al procedimiento quirúrgico, las cuales fueron promediadas para cada rata individualmente y representaba el 100% de los eventos. En el periodo post-operatorio se realizó 1 sesión diaria durante 15 días. Los ensayos fueron realizados durante 15 minutos, donde los primeros 5 minutos fueron de adaptación y los últimos 10 de evaluación conductual. Los parámetros evaluados fueron: desplazamiento horizontal (motilidad), en el cual se consideraba presente cuando dentro del laberinto la rata se desplazaba de un compartimiento a otro y desplazamiento vertical (conducta exploratoria) se consideró presente cuando la rata se levantaba sobre sus dos extremidades traseras en el laberinto.

Evaluación cualitativa de trastornos neurológicos

Fueron realizados diariamente durante los 15 días del post-operatorio. Los parámetros evaluados fueron: ptosis palpebral, equilibrio, marcha, paresia o parálisis. **Ptosis palpebral:** grado de caída del párpado de la rata en una escala de 0 a 2 en la cual el 0 representaba sin ptosis, 1 ptosis unilateral, 2 ptosis bilateral; **equilibrio:** capacidad de la rata de caminar y/o mantener el equilibrio al semirotar el listón de madera de 62,5 x 3,5cm colocado a 29 cm del piso, se consideró normal cuando el animal marcha sobre la madera sin caerse o cuando se sostiene firmemente en el trozo de madera móvil (0 puntos), de lo contrario si se cae se consideró que presenta una alteración del equilibrio (1 punto); **marcha:** capacidad de las ratas de caminar sobre una superficie plana, se consideró alterada (1 punto) cuando el animal camina en círculos o lateralizado; **parálisis:** es considerada como la pérdida total de movimientos en el miembro evaluado (1 punto), fue evaluada al observar la actitud de la rata al ejecutar un movimiento.

Análisis de los datos

Los resultados son presentados como la media \pm error estándar de la media (EEM) en porcentajes, con transformación y verificación mediante la conversión de los índices (27). Las diferencias observadas entre los diferentes grupos fue determinada mediante análisis de varianza (ANOVA). La significancia estadística fue considerada si $p < 0,05$.

RESULTADOS

En total fueron intervenidas quirúrgicamente 46 ratas, de las cuales 7 murieron por complicaciones relacionadas con la técnica quirúrgica y la anestesia. De estas 7 ratas, 1 (14,3%) perteneció al grupo Control-Control, 2 (28,6%) al Control-Fisiológica, 1 (14,3%) al grupo magnesio y 3 (42,9%) al grupo heparina. No hubo muertes peri-operatorias en el grupo vitamina E. La totalidad de estas muertes fueron consideradas accidentales y no tomadas en cuenta para el análisis definitivo.

Mortalidad: De las 39 ratas sobrevivientes, 9 (23%) murieron en los siguientes 15 días posteriores a la operación. En el grupo Control-Control de las 7 ratas sobrevivientes, 3 (42,9%) murieron en un promedio de 6,33 días posteriores a la operación; en

el grupo Control-Fisiológica de 8 ratas murió 1 (12,5%) a los 9 días posteriores a la intervención quirúrgica; en el grupo heparina, de 8 ratas sobrevivientes 1 (12,5%) murió a los 5 días post-operatorios; en el grupo magnesio de 8 ratas sobrevivientes murieron 2 ratas (25%) en promedio 2,5 días posteriores a la intervención y en el grupo de vitamina E de 8 ratas sobrevivientes murieron 2 (25%) en promedio 8 días posteriores a la intervención.

Motilidad: En el grupo Control-Control se obtuvo un promedio igual a $82,43 \pm 4,85\%$; en el grupo Control-Fisiológica se obtuvo un promedio de $64,85 \pm 4,85\%$; en el grupo de magnesio se obtuvo en promedio $53,68 \pm 5,47\%$; en el grupo de vitamina E se obtuvo un $74,12 \pm 7,70\%$ y en el grupo de heparina se obtuvo un promedio de $94,51 \pm 8,54\%$. El grupo heparina presentó una diferencia significativa ($p < 0,01$) con respecto al grupo Control-Fisiológica, no observándose diferencia significativa entre los otros grupos. De los datos obtenidos se observó que el mayor promedio de motilidad lo obtuvo el grupo de heparina y que el menor promedio fue obtenido por el grupo de magnesio y de Control-Fisiológica.

Conducta Exploratoria: El grupo Control-Control presentó un promedio de $113,35 \pm 15,25\%$; el grupo Control-Fisiológica obtuvo un promedio de $66,98 \pm 7,41\%$; el grupo de magnesio obtuvo un promedio de $97,79 \pm 12,30\%$; el grupo de vitamina E contó con un promedio de $86,09 \pm 11,31\%$ y el grupo heparina presentó un promedio de $174,44 \pm 29,84\%$. El grupo heparina presentó una diferencia significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo Control-Fisiológica y de ($p < 0,01$) con respecto al grupo Control-Control, y el grupo magnesio presentó una diferencia significativa con respecto al grupo Control-Control ($p < 0,05$). A partir de estos datos se pudo observar que el mayor promedio en cuanto a conducta exploratoria lo obtuvo el grupo de heparina y el menor el grupo de Control-Fisiológica.

Ptosis palpebral: El grupo Control-Control presentó un promedio de $0,47 \pm 0,087$; el grupo Control-Fisiológica contó con un promedio de $0,7 \pm 0,36$; el grupo magnesio obtuvo un promedio de $0,24 \pm 0,12$; el grupo vitamina E obtuvo un promedio de $0,67 \pm 0,046$; el grupo heparina contó con un promedio igual a $1,23 \pm 0,11$. El grupo heparina presentó una diferencia significativa ($p < 0,001$) con

respecto a los grupos Control-Control y Control-Fisiológica y el grupo magnesio presento una diferencia significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo Control-Fisiológica. Se observó que el mayor promedio de ptosis lo obtuvo el grupo de heparina mientras que el menor lo obtuvo el grupo de magnesio.

Trastornos motores: El grupo Control-Control tuvo un promedio de $1,33 \pm 0,31\%$; el grupo Control-Fisiológica tuvo un promedio de $0,42 \pm$

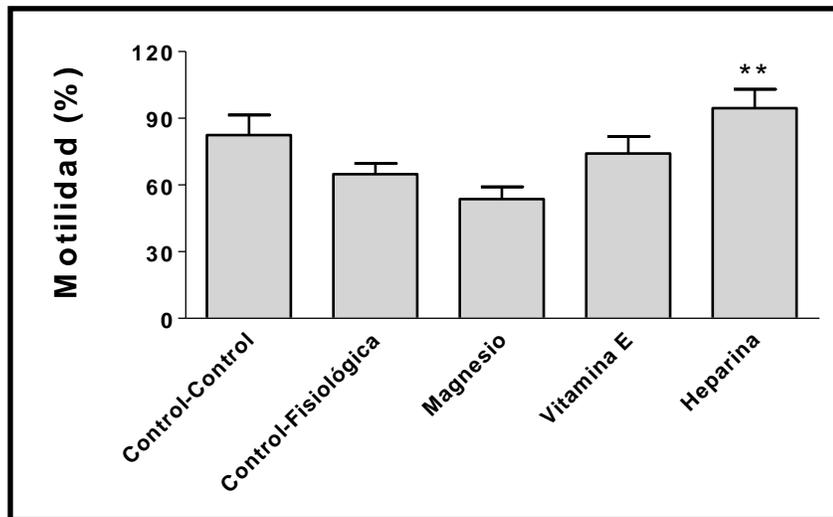
$0,33\%$; el grupo magnesio presentó un promedio de $0,12 \pm 0,06\%$; el grupo de vitamina E obtuvo un promedio de $0,19 \pm 0,10\%$; y el grupo de heparina alcanzó un promedio de $0,18 \pm 0,09\%$. Todos los grupos presentaron diferencias significativas con respecto al grupo Control-Control ($p < 0,001$), y a su vez el grupo Control-Control obtuvo el mayor promedio de trastornos motores mientras que el grupo magnesio tuvo el menor promedio.

Tabla I. Parámetros clínicos observados en las ratas sobrevivientes a la apoplejía isquémica.

	MOTILIDAD	CONDUCTA EXPLORATORIA	PTOSIS PALPEBRAL	TRASTORNOS MOTORES
Control-Control	$82,43 \pm 4,85$	$113,35 \pm 15,25$	$0,47 \pm 0,087$	$1,33 \pm 0,31$
Control-Fisiológica	$64,85 \pm 4,85$	$66,98 \pm 7,41$	$0,7 \pm 0,36$	$0,42xxx \pm 0,33$
Grupo Magnesio	$53,68 \pm 5,47$	$97,79x \pm 12,30$	$0,24*** \pm 0,12$	$0,12xxx \pm 0,060$
Grupo Vitamina E	$74,12 \pm 7,70$	$86,09 \pm 11,31$	$0,67 \pm 0,046$	$0,19xxx \pm 0,10$
Grupo Heparina	$94,51** \pm 8,50$	$174,4***xx \pm 29,84$	$1,23***xxx \pm 0,11$	$0,18xxx \pm 0,09$

Los datos representan la media \pm EEM.
 *: Diferencia significativa con respecto al grupo Control-Fisiológica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.
 x: Diferencia significativa con respecto al grupo Control-Control. xp $< 0,05$, xxp $< 0,01$, xxxp $< 0,001$.

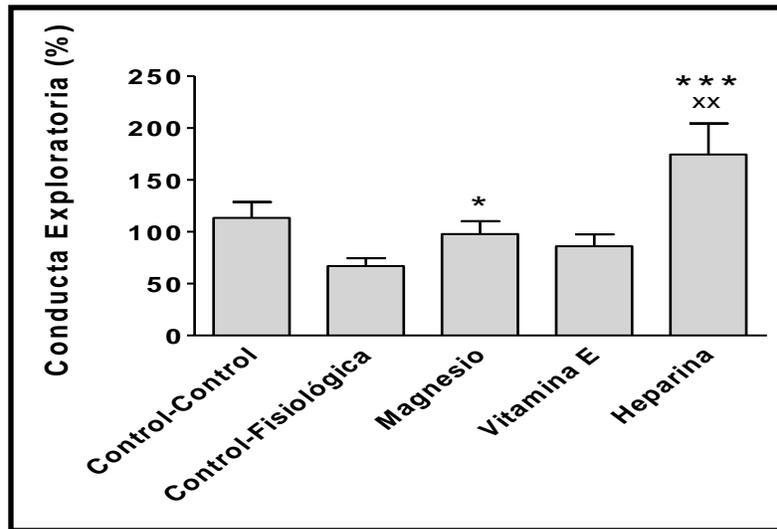
Figura 1. Desplazamiento motor horizontal (motilidad) en ratas sometidas a isquemia cerebral general.



Muestra como varió la motilidad en cada uno de los grupos en el postoperatorio respecto al preoperatorio, es expresada en % y representa la capacidad del animal de desplazarse en un plano horizontal. Se puede observar que el grupo que presentó menores alteraciones en la motilidad fue

heparina y los que mayores alteraciones presentaron fueron el grupo de magnesio y el de Control-Fisiológica, sin embargo, estadísticamente solo se obtuvo que el grupo heparina presentó una diferencia significativa (** $p < 0,01$) con respecto al grupo Control-Fisiológica.

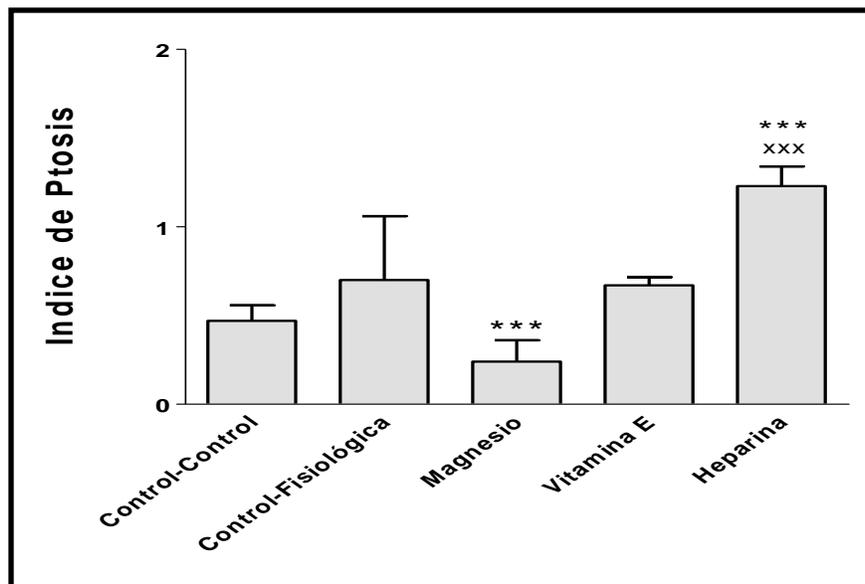
Figura 2. Desplazamiento motor vertical (conducta exploratoria) en ratas sometidas a isquemia cerebral general.



Muestra como varió la conducta exploratoria en cada uno de los grupos en el postoperatorio respecto al preoperatorio, es expresada en % y representa la capacidad del animal de levantarse sobre sus dos extremidades traseras, es decir mide el desplazamiento vertical. Se puede observar que el grupo que presentó menores alteraciones en la motilidad fue heparina y los que mayores alteraciones presentaron fueron el grupo de vitamina E y el de Control-

Fisiológica, sin embargo, estadísticamente se obtuvo que el grupo heparina presentó una diferencia significativa de (***) $p < 0,001$ con respecto al grupo Control-Fisiológica y de (**) $p < 0,01$ con respecto al grupo Control-Control; por otra parte el grupo magnesio presentó una diferencia significativa con respecto al grupo Control-Fisiológica (* $p < 0,05$).

Figura 3. Ptosis palpebral en ratas sometidas a isquemia cerebral general.



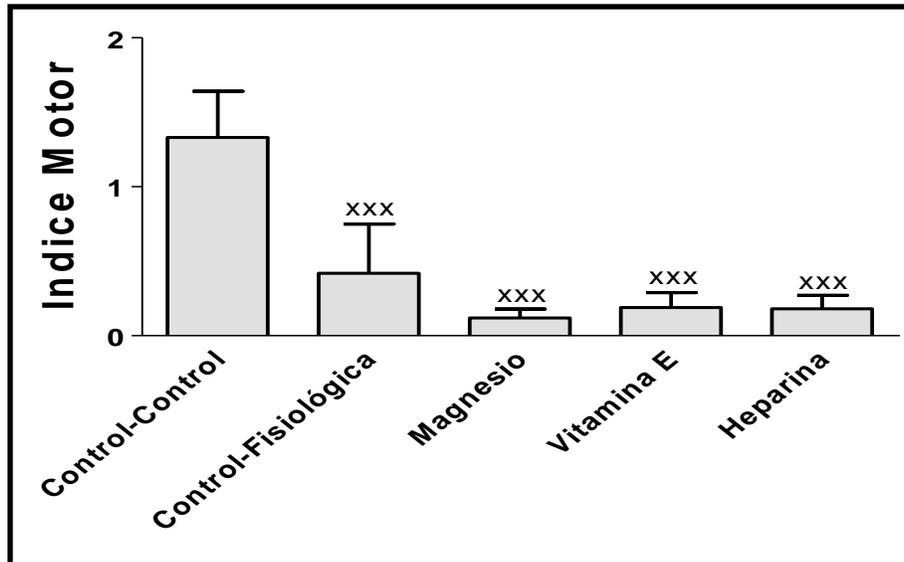
Se refleja el índice de ptosis en cada uno de los grupos, el mismo fue un parámetro cualitativo registrado durante el período post-operatorio en el

que se clasificó el grado de caída del párpado en una escala del 0 al 2 (ver materiales y métodos). Se observó que el mayor promedio de ptosis lo obtuvo

el grupo de heparina mientras que el menor lo obtuvo el grupo de magnesio. Estadísticamente heparina presentó una diferencia significativa de $***p < 0.001$ con respecto al grupo Control fisiológica

y de $***p < 0.001$ con respecto al grupo Control-Fisiológica; el grupo magnesio presentó una diferencia significativa $***p < 0.001$ con respecto al grupo Control-Fisiológica.

Figura 4. Trastornos motores en ratas sometidas a isquemia cerebral general.



Se muestra como varió el índice motor en cada uno de los grupos, el cual se correspondió a alteraciones en la marcha, equilibrio y en la praxia, valoradas con 0 y 1 punto. Los resultados obtenidos mostraron que el grupo Control-Control presentó en forma significativa ($***p < 0,001$) el mayor número de trastornos motores al ser comparados con el resto de los grupos.

DISCUSIÓN

En nuestro modelo de isquemia global, se interrumpió el flujo sanguíneo de las arterias carótidas comunes, desabasteciendo las áreas irrigadas por las arterias cerebrales anterior y media, lo cual desencadenó un amplio daño neuronal manifestado a través de alteraciones de la motilidad, índice motor, ptosis palpebral y conducta exploratoria. Estudios fisiopatológicos de accidentes cerebro vasculares han demostrado, que la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes en roedores produce una isquemia cerebral de manera consistente (28), con daños celulares dentro de áreas selectivamente vulnerables del encéfalo, incluyendo a las neuronas de la tercera capa de la corteza cerebral, subcampos hipocampales y cara dorsolateral del cuerpo estriado (29). La magnitud de los daños estructurales y funcionales son dependientes de la

severidad y duración de la isquemia, encontrando que los períodos prolongados tienden a acelerar la evolución de los cambios celulares (30) y las manifestaciones clínicas del daño neurológico tienden a ser mucho más evidentes, severas y prolongadas, permitiendo una evaluación clínica más objetiva.

En los modelos de isquemia global producto de la ligadura unilateral de una de las arterias carótidas comunes, se producen alteraciones clínicas muy leves (ligera ptosis palpebral contralateral) sin alteraciones motoras evidentes, lo cual demuestra la eficiencia del polígono de Willis en las ratas en mantener el flujo de sangre hacia el área afectada. Este modelo sería evaluable histopatológicamente, mas no desde el punto de vista clínico, debido a la falta de signos evidentes de daño cerebral.

Las consecuencias clínicas de isquemia global por ligadura bilateral de las carótidas comunes fueron claramente observadas en el grupo Control-Control donde se observó una mayor mortalidad y un mayor índice de trastornos motores (ver resultados, figuras 3 y 4), no obstante ser indiscutible estos hallazgos, no se lograron reproducir en el grupo Control-Fisiológica, donde se observó la menor mortalidad y los trastornos motores fueron menores con respecto

al grupo Control-Control. Para explicar estos resultados se plantea la existencia de un mediador del daño neuronal que se encuentra o se forma a partir de elementos de la sangre y difunde hacia el tejido cerebral donde ejerce su efecto patológico. En este sentido ha sido reportado que durante la cascada de la coagulación es activada la trombina, la cual a altas concentraciones actúa a través de la activación del receptor PAR-1 y conjuntamente con la plasmina incrementa la permeabilidad capilar contribuyendo al deterioro de la barrera hematoencefálica; permitiendo la entrada de proteínas de alto peso molecular al SNC, como por ejemplo la apolipoproteína E, la cual por acción de la trombina genera un péptido de 22 kDa con efectos neurotóxicos, el cual es considerado un mediador del daño neuronal al actuar directamente sobre los astrocitos, neuronas y células endoteliales de los capilares neuronales⁽³¹⁾. La explicación directa que se da al mencionado hecho se basa en que cuando se administra solución fisiológica a través de la cánula arterial, se limpia en cierta forma la sangre acumulada en los vasos, disminuyéndose el porcentaje de precursores del péptido de 22 kDa y por lo tanto el porcentaje del factor neurotóxico. Sin embargo, es importante mencionar, que el grado de trastornos motores, basados en motilidad, conducta exploratoria y ptosis, fue mayor en el grupo de solución fisiológica, ya que; la solución fisiológica simplemente disminuye la producción del factor neurotóxico, pero no evita por completo su formación, hecho contrario a lo que ocurre con la heparina.

El grupo heparina presentó una mortalidad equivalente al grupo Control-Fisiológica, el mayor índice de motilidad y de conducta exploratoria con respecto a los grupos Control-Control y Control-Fisiológica, y el menor índice de trastornos motores con respecto al grupo Control-Fisiológica, aunque contradictoriamente fue el grupo que alcanzó mayor índice de ptosis palpebral. Para explicar éstos resultados se plantea que la heparina, un glucosaminoglucano, con propiedades anticoagulantes inhibe a la protrombina, evitando la activación de la trombina durante la cascada de la coagulación y la producción del fragmento neurotóxico de 22 kDa, frenando de ésta manera el efecto neurotóxico del péptido⁽³²⁾. El alto índice de ptosis alcanzado por el grupo heparina se pudo deber a un severo daño a nivel de los pedúnculos cerebrales durante la isquemia global, a través de

factores neurotóxicos diferentes al factor de 22 kDa, pero si vinculados con el magnesio, lo cual nos permite explicar el hecho de que la heparina es el grupo que presentó mayor índice de ptosis a diferencia del grupo magnesio que obtuvo el menor índice de ptosis palpebral.

Con respecto al grupo magnesio, inesperadamente presentó las muertes más tempranas, hecho de difícil explicación, ya que; las ratas sobrevivientes de éste grupo presentaron un bajo índice de trastornos motores, de motilidad, pero un mayor índice de conducta exploratoria con respecto al grupo Control – Fisiológica y sorpresivamente el menor índice de ptosis; hecho que nos permiten concluir que el magnesio disminuye el índice de morbilidad en las ratas, más no el índice de mortalidad. Dichos hallazgos se pueden explicar considerándose al magnesio un ion divalente capaz de fungir como un bloqueante no competitivo de los canales NMDA, impidiendo la entrada de Ca^{+2} al interior celular⁽³³⁾. Chen y col.,⁽³⁴⁾ han demostrado la utilidad de antagonistas competitivos del receptor NMDA en la prevención de los daños causados por los infartos cerebrales. A su vez Boujelben y col.,⁽³⁵⁾ han reportado que altas concentraciones de magnesio inhiben la peroxidación de los lípidos, de igual manera se ha demostrado también que el magnesio compite con los iones de hierro por los sitios de unión a los fosfolípidos⁽³⁶⁾. Igualmente Davis y col.,⁽³³⁾ afirmó que el magnesio posee un alto potencial de salvar el área neuronal de penumbra gracias a su efecto bloqueante sobre los receptores glutamatergicos ionotrópicos, clasificándolo como un eficiente neuroprotector. Por otra parte Redwood y col.,⁽³⁷⁾ reportaron que la administración endovenosa de sulfato de magnesio, protege significativamente el tejido cardíaco durante la isquemia aguda del miocardio y posee efectos beneficiosos para el control de la angina inestable. Xu y col.,⁽³⁸⁾ describieron que durante los períodos de reperfusión cardíaca posterior a la isquemia, altas concentraciones de magnesio muestran un significativo efecto protector a través de la inhibición de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} y de la síntesis de ATP en las mitocondrias cardíacas, lo que origina la disminución de la concentración de calcio, evitando de ésta manera los daños originados durante la reperfusión.

Al igual que el grupo magnesio el grupo vitamina E obtuvo el mismo porcentaje de mortalidad, sin embargo; las ratas sobrevivientes presentaron una rápida recuperación clínica y una expectativa de vida mayor. En este grupo no se observó diferencia significativa en el índice motilidad, conducta exploratoria y ptosis palpebral respecto a los demás grupos, sin embargo; presentaron índice de trastornos motores significativamente menores con respecto al grupo Control-Fisiológica. La vitamina E fue empleada considerándose un antioxidante hidrofóbico que al actuar a nivel de la membrana neuronal reacciona con el radical hidroxilo(OH) y alcoxi, donando hidrogeniones, que los estabiliza evitando de ésta manera la peroxidación de la membrana neuronal ⁽³⁹⁾.

De acuerdo con las observaciones realizadas, se confirma la visión multifactorial de los procesos neurodegenerativos cerebrales, los cuales desencadenan una serie de alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales del tejido cerebral. Estas lesiones son atribuidas al incremento en la entrada del Ca²⁺ al espacio intracelular a través de canales dependientes de voltaje y/o por los preceptores NMDA, a la formación excesiva de radicales libres y a la formación del fragmento de 22 kDa. Los mecanismos involucrados en el daño neuronal podrían variar de una región a otra, planteando que el tratamiento de la isquemia cerebral debe plantear un protocolo multifactorial que incluya fármacos barredores de radicales libres, antagonistas de receptores NMDA, bloqueadores de canales dependientes de voltaje, antagonistas de receptores PAR-1 y/o inhibidores de trombina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lavados, P.M.; Hennis, A.J.; Fernandes, J.G.; Medina, M.T.; Legetic, B.; Hoppe, A.; Sacks, C.; Jadue, L.; Salinas, R. (2007). Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean. *Lancet Neurol*, 6, 362-372.
2. Broughton, B.R.; Reutens, D.C.; Sobey, C.G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40, e331-e339.
3. Besancon, E.; Guo, S.; Lok, J.; Tymianski, M.; Lo, E.H. (2008). Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 268-275.
4. Lau, A.; Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*, 460, 525-542.
5. Paoletti, P.; Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7, 39-47.
6. Szydłowska, K.; Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47, 122-129.
7. Pinton, P.; Giorgi, C.; Siviero, R.; Zecchini, E.; Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27, 6407-6418.
8. Loh, K.P.; Huang, S.H.; De Silva, R.; Tan, B.K.; Zhu, Y.Z. (2006). Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res*, 3, 327-337.
9. Balsinde, J.; Pérez, R.; Balboa, M.A. (2006). Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 1344-1350.
10. Hüttemann, M.; Lee, I.; Pecinova, A.; Pecina, P.; Przyklenk, K.; Doan, J.W. (2008). Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr*, 40, 445-456.
11. Orriss, I.R.; Knight, G.E.; Utting, J.C.; Taylor, S.E.; Burnstock, G.; Arnett, T.R. (2009). Hypoxia stimulates vesicular ATP release from rat osteoblasts. *J Cell Physiol*, 220, 155-162.
12. Wheaton, W.W.; Chandel, N.S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, C385-C393.
13. Nishino, T. (1994). The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem*, 116, 1-6.
14. Viel, E.C.; Benkirane, K.; Javeshghani, D.; Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. (2008). Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular

- superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H281-H288.
15. Nanetti, L.; Taffi, R.; Vignini, A.; Moroni, C.; Raffaelli, F.; Bacchetti, T.; Silvestrini, M.; Provinciali, L.; Mazzanti, L. (2007). Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem*, 303, 19-25.
 16. Orrenius, S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, 39, 443-455.
 17. Henrich-Noack, P.; Striggow, F.; Reiser, G.; Reymann, K.G. (2006) Preconditioning with thrombin can be protective or worsen damage after endothelin-1-induced focal ischemia in rats. *J Neurosci Res*, 83, 469–475.
 18. Xi, G.; Keep, R.; Hoff, J. (2006) Mechanisms of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Lancet Neurol*, 5, 53–63.
 19. Narayan, S.; Prasanna, G.; Tchedre, K.; Krishnamoorthy, R.; Yorio, T. (2010). Thrombin-induced endothelin-1 synthesis and secretion in retinal pigment epithelial cells is rho kinase dependent. *J Ocul Pharmacol Ther*, 26, 389-397.
 20. Jeon, O.; Ryu, S.H.; Chung, J.H.; Kim, B.S. (2005). Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. *J Control Release*, 105, 249-259.
 21. Xi, G.; Reiser, G.; Keep, R.F. (2003). The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem*, 84, 3-9.
 22. Xue, M.; Del Bigio, M.R. (2001). Acute tissue damage after injections of thrombin and plasmin into rat striatum. *Stroke*, 32, 2164-2169.
 23. Tolar, M.; Marques, M.A.; Harmony, J.A.; Crutcher, K.A. (1997). Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *J Neurosci*, 17, 5678-5686.
 24. Evans, K.C.; Berger, E.P.; Cho, C.G.; Weisgraber, K.H.; Lansbury, P.T. Jr. (1995). Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 763-767.
 25. Richard, B.; Arocas, V.; Guillin, M.C.; Michel, J.B.; Jandrot-Perrus, M.; Bouton, M.C. (2004). Protease nexin-1: a cellular serpin down-regulated by thrombin in rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 201, 138-145.
 26. Vaughan, P.J.; Su, J.; Cotman, C.W.; Cunningham, D.D. (1994). Protease nexin-1, a potent thrombin inhibitor, is reduced around cerebral blood vessels in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 668, 160-170.
 27. Zar JH. (1984) "Biostatistical analysis. 2nd." Ed. Prentice Hall. USA.
 28. Crockard, A.; Ianotti, F.; Hunstock, A.T.; Smith, R.D.; Harris, R.J. and Symon, L. (1998). Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke*, 11, 494-498.
 29. Hossman, K.A. (1993). Ischemia-mediate neuronal injury. *Resuscitation*, 26, 225-235.
 30. Farkas, E.; Luiten, P.G.; Bari, F. (2007). Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 54, 162-180.
 31. Arai, T.; Miklossy, J.; Klegeris, A.; Guo, J.P.; McGeer, P.L. (2006). Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 19-25.
 32. Yin, X.; Wright, J.; Wall, T.; Grammas, P. (2010). Brain endothelial cells synthesize neurotoxic thrombin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 176, 1600-1606.
 33. Davis, M.; Perry, R.H. and Mendelow, A.D. (1997). The effect of non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonism on cerebral

- edema and cerebral infarct size in the aging ischemic brain. *Acta Neurochir*, 70, 30-33.
36. Chen, M.; Lu, T.J.; Chen, X.J.; Zhou, Y.; Chen, Q.; Feng, X.Y.; Xu, L.; Duan, W.H.; Xiong, Z.Q. (2008). Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke*, 39, 3042-3048.
37. Boujelben, M.; Ghorbel, F.; Vincent, C.; Makni-Ayadi, F.; Guermazi, F.; Croute, F.; El-Feki, A. (2006). Lipid peroxidation and HSP72/73 expression in rat following cadmium chloride administration: interactions of magnesium supplementation. *Exp Toxicol Pathol*, 57, 437-443.
38. Kostellow, A.B.; Morrill, G.A. (2004). Iron-catalyzed lipid peroxidation in aortic cells in vitro: protective effect of extracellular magnesium. *Atherosclerosis*, 175, 15-22.
39. Redwood, S.R.; Bashir, Y.; Huang, J.; Leatham, E.W.; Kaski, J.C. and Camm, A.J. (1997). Effect of magnesium sulphate in patients with unstable angina. A double blind, randomized, placebo-controlled study. *Euro Heart J*, 18, 1269-1277.
40. Xu, H. and Shi, A.Y. (1996). Effect of magnesium on post ischemic reperfused myocardial mitochondrial. *Sheng Li Xue Bao*, 48, 303-306.
41. Halliwell, B. and Gutteridge, M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219, 1-14.