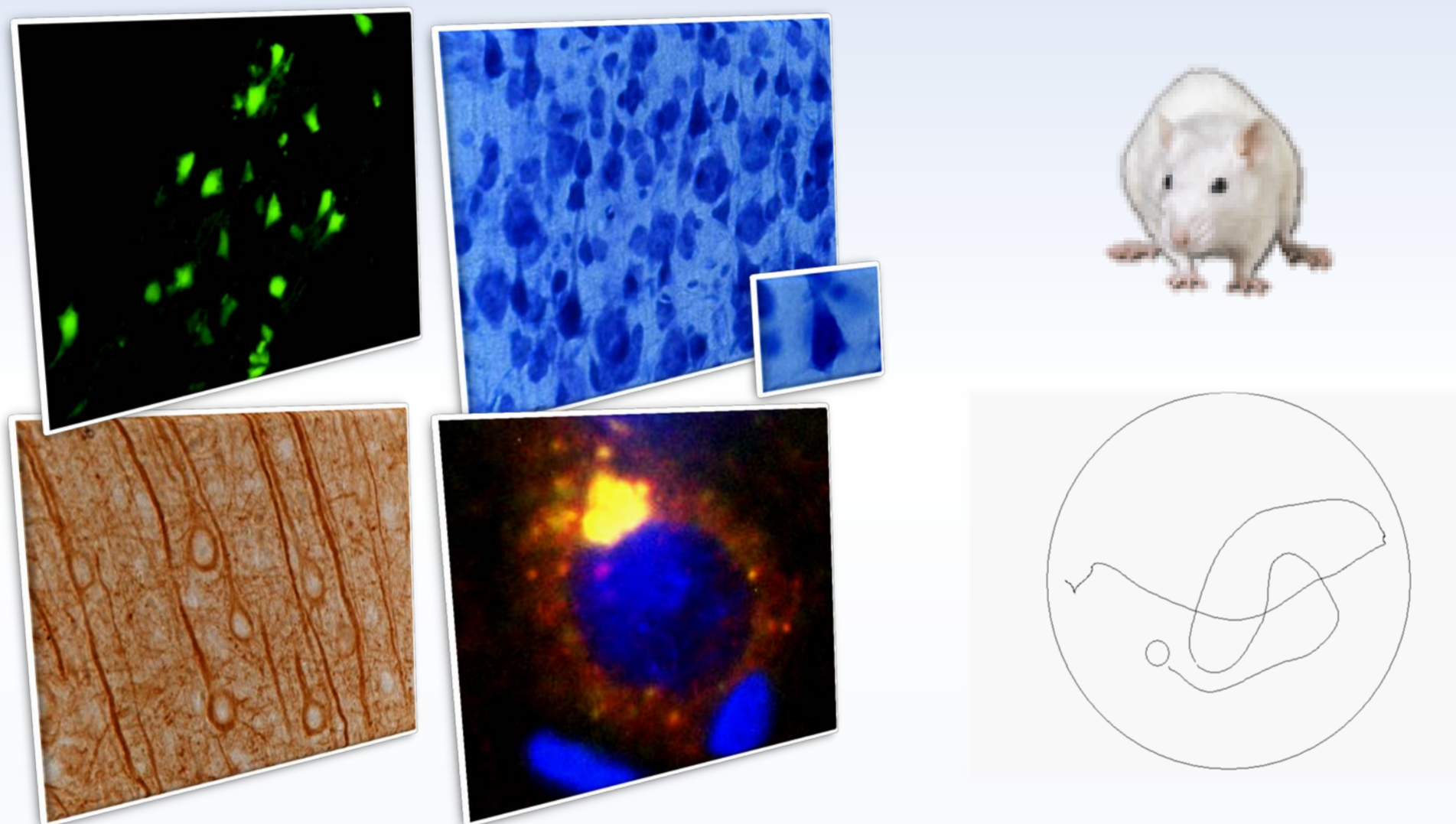


EL EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL BDNF Y LOS COMPLEJOS NR2B/PSD-95 CONLLEVA A UNA MEJORA EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN UNA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA

JUAN IGNACIO MUÑOZ MANCO



Instituto de Biología
Facultad de ciencias exactas y naturales
Universidad de Antioquia
Medellín, 2011

**EL EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL BDNF Y LOS COMPLEJOS
NR2B/PSD-95 CONLLEVA A UNA MEJORIA EN EL APRENDIZAJE Y
MEMORIA ESPACIAL EN UNA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA**

JUAN IGNACIO MUÑOZ MANCO



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MEDELLÍN

2011

**EL EFECTO DE LA ATORVASTATINA SOBRE EL BDNF Y LOS COMPLEJOS
NR2B/PSD-95 CONLLEVA A UNA MEJORA EN EL APRENDIZAJE Y
MEMORIA ESPACIAL EN UNA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA**

JUAN IGNACIO MUÑOZ MANCO

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Asesora:

Gloria Patricia Cardona Gómez. Bsc, PhD.

Co-asesora:

Johanna Andrea Gutiérrez Vargas. Bsc, Msc.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MEDELLÍN

2011

DEDICATORIA

*A mi madre **María Eunice Manco Martínez**, quien es una gran mujer
y una excelente madre, quien me ha apoyado y ayudado desde siempre,
de quien aprendo cada día más sobre todos los aspectos de mi vida,
a quien siempre tendré en mi corazón y mi alma*

*A mi hermano **Santiago Muñoz Manco** que me ha dado la alegría de
una juventud constante, de quien hace constante una sonrisa en mi
y a quien le debo (junto con mi madre) el pilar de mi felicidad*

*A mi tía **María Abigail Cano Álvarez** quien ha sido un apoyo
constante en mi vida*

*A la memoria de mi padre **Jose E. Muñoz Cano***

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por darme la vida y a mi hermano por ser mi amigo. A toda mi familia quienes han sido un completo apoyo durante toda mi vida.

A mis amigos Carlos Zuluaga, Luis Kamil Buitrago, Camilo Álvarez, Sebastián Díaz, Felipe Guevara Aristizabal, Laura Flórez, Laura Rueda (y todos los que no nombro en estos momentos), quienes han sido una muy buena influencia en mi vida y en mi carrera.

A la Universidad que Antioquia que me ha permitido formarme como un profesional y como un ser consciente socialmente.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al instituto de Biología y todos sus profesores, especialmente a Mario Quijano, José Rubio Ramírez, Eliana Cuartas, John Jairo Ramírez, Ricardo Callejas Posada y Ana Victoria Gómez.

A mi tutora y profesora Gloria Patricia Cardona Gómez quien ha sido un gran ejemplo a seguir, mostrándome lo hermoso de la ciencia, orientándome en mis ideas, por creer en mí y en mi trabajo. Una gran persona.

A mi co-tutora Johanna Andrea Gutiérrez Vargas, quién me ha guiado y ensañado muchas cosas académicamente.

A todo el grupo de Neurociencias de Antioquia, especialmente al área de neurobiología celular y molecular y a todos sus integrantes, quienes han sido un valioso ejemplo de trabajo en grupo y de excelencia académica.

CONTENIDO

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCION	5
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	7
3. 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
3. 2. FORMULACION DEL PROBLEMA.....	9
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. MARCO TEORICO.....	12
5. 1. Isquemia cerebral.....	12
5. 1. 1. Excitotoxicidad en isquemia cerebral.....	14
5. 1. 2. Homeóstasis neuronal Vs isquemia cerebral.....	15
5. 2. Proteínas de sinapsis.....	17
5. 2. 1. Recptor NMDA (N-METIL-D-ASPARTATO)	17
5. 2. 2. Proteína post-sináptica 95 (PSD-95)	21
5. 3. Factores tróficos e isquemia cerebral	22
5. 3. 1. Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)	23
5. 4. Hipocampo, aprendizaje y memoria espacial.....	24
5. 5. neuroprotección en isquemia cerebral	27

5. 5. 1. ESTATINAS.....	27
5. 5. 1. 1. Efectos pleiotrópicos de las estatinas.....	28
6. HIPÓTESIS	31
7. OBJETIVOS	32
8. MATERIALES Y MÉTODOS	33
9. RESULTADOS	48
10. DISCUSIÓN	70
11. CONCLUSIONES.....	78
12. PERSPECTIVAS	79
13. BIBLIOGRAFIA	80
14. ANEXOS	96

1. RESUMEN

La isquemia cerebral es un accidente cerebrovascular (ACV) generado a partir de la oclusión de una o varias arterias cerebrales, principalmente la arteria cerebral media, conllevando a una disminución de nutrientes como glucosa y oxígeno. En el caso de una isquemia cerebral focal, esto ocasiona la muerte neuronal del tejido generando dos zonas características conocidas como núcleo isquémico y zona de penumbra. En el modelo de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO), las áreas más sensibles a este insulto isquémico son la corteza cerebral, el putamen caudado y el hipocampo como zonas de penumbra. El evento isquémico genera una desregulación de proteínas implicadas en la sobrevivencia y plasticidad neuronal. Un ejemplo de estas son los factores tróficos como BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA (N-METIL-D-ASPARTATO) y proteínas postsinápticas como PSD-95. Lo que conlleva a un daño celular, bioquímico y funcional evidenciado por el déficit en la capacidad de aprendizaje y memoria en el caso de una alteración en hipocampo. Las estatinas, inhibidores selectivos de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa han mostrado tener efecto neuroprotector en ACV como la isquemia cerebral. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto neuroprotector de la atorvastatina sobre proteínas implicadas en plasticidad sináptica y procesos de aprendizaje y memoria espacial en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata. Inicialmente, ratas Wistar macho (con 8 semanas de edad y peso promedio de 350g) se sometieron a una isquemia cerebral focal transitoria (t-MCAO) y se les administró atorvastatina vía oral a una concentración de 10 mg/kg durante tres días consecutivos a partir de las 6 horas post-isquemia. A los siete días post-isquemia se realizó la evaluación de aprendizaje y memoria espacial por medio del laberinto acuático de Morris. Posteriormente, los animales fueron sacrificados para realizar el análisis histológico mediante la tinción de Nissl para ver la morfología celular, Fluorojade para observar la acidosis metabólica, inmunohistoquímica para MAP-2 y NeuN, e inmunofluorescencia para NR2B y PSD-95. También se realizó Inmunoprecipitación de proteínas para el complejo NR2B/PSD-95 y ELISA para la determinar los niveles de BDNF. Nuestros resultados muestran que animales

isquémicos tratados con atorvastatina recuperan la morfología celular, disminuyen la acidosis metabólica y recuperan el marcaje de NeuN y MAP-2 en las áreas de lesión: La corteza cerebral, el putamen caudado y el hipocampo. También evidenciamos que la atorvastatina restablece los niveles de BDNF en la corteza cerebral, lo cual se relaciona con la recuperación del complejo NR2B/PSD-95. Esta recuperación se evidencia a nivel funcional en el laberinto acuático de Morris, donde animales isquémicos tratados con atorvastatina poseen un menor tiempo de latencia tanto en la fase de aprendizaje como en la retención comparado con aquellos animales que no se les suministro la estatina. Estos datos sugieren que el efecto neuroprotector de la atorvastatina a nivel celular y molecular conduce a una restauración funcional del déficit de aprendizaje y memoria espacial en ratas con isquemia cerebral focal transitoria.

Palabras clave: Corteza cerebral, hipocampo, t-MCAO, Atorvastatina, MAP-2, NeuN, NR2B/PSD-95, BDNF, aprendizaje y memoria espacial, laberinto acuático de Morris.

2. INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral es un accidente cerebrovascular (ECV) que actualmente representa un alto problema de salud pública, ya que a nivel mundial es considerada la primera causa de incapacidad (Hossmann, 2008; OMS, 2009) y en Colombia la segunda en personas mayores de 45 años (Ministerio de protección social, 2008), lo que conlleva a elevados costos sociales que influyen en la calidad de vida de las personas que la padecen (OMS, 2004). Esta enfermedad afecta la estructura y viabilidad de la población neuronal en diferentes zonas cerebrales. Una de las zonas afectadas por la isquemia cerebral es el hipocampo, zona relacionada con procesos de plasticidad sináptica que determinan el aprendizaje y memoria espacial (Calabresi et al., 2003; Briones et al., 2006).

Una de las estrategias de neuroprotección promisorias en isquemia son las estatinas, las cuales son inhibidores selectivos de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A (HMG-CoA) reductasa la cual participa en la síntesis de colesterol y derivados isoprenoides (Liao, 2005). Estas han mostrado tener diferentes efectos protectores en el sistema nervioso, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Hoglund and Blennow, 2007; Arvanitakis et al., 2008) e isquemia cerebral (Berger et al, 2008; Van der Most et al., 2009; Céspedes-Rubio et al., 2010; Gutiérrez-Vargas et al., en preparación). Previos estudios llevados a cabo en isquemia cerebral muestran que las estatinas reducen el volumen del infarto cerebral, mejoran la función neurológica e incrementan el flujo sanguíneo cerebral (Bosel et al., 2005; Cimino et al., 2007) además de proteger los vasos sanguíneos y favorecer la angiogénesis, neurogénesis y la sinaptogénesis (Zhang et al., 2005), procesos indispensables en la recuperación del daño isquémico.

Sin embargo, se hace necesario evaluar con mayor profundidad tratamientos y estrategias efectivas de neuroprotección que conlleven a una clara recuperación funcional de las personas que la padecen. Por tanto, como parte de estudios pre-clínicos en la terapia farmacológica, el objetivo principal de este trabajo es evaluar el

efecto neuroprotector de la atorvastatina sobre proteínas implicadas en plasticidad sináptica y procesos de aprendizaje y memoria espacial en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata, lo cual podrá fundamentar la recuperación histológica y bioquímica de la atorvastatina en el tejido isquémico como lo muestran previos resultados obtenidos en el Grupo de Neurociencias de Antioquia, donde a 72 horas de tratamiento post-isquemia con atorvastatina en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria (t-MCAO) en rata reduce el volumen de infarto así como marcadores de neurodegeneración y activación de vías de supervivencia (Céspedes-Rubio et al., 2010 Gutiérrez-Vargas et al., en preparación).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

3. 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el ACV es considerado la primera causa de incapacidad a nivel mundial con una tasa de mortalidad alrededor de un 30% en países industrializados (Hossmann, 2008; Murphy and Corbett, 2009; OMS, 2009). En Colombia, es la segunda tasa de mortalidad en personas mayores de 45 años de edad (Ministerio de protección social, 2008) y se calcula que 1 de cada 6 personas puede llegar a sufrir al menos un evento isquémico en la vida, donde 1 de cada 3 pacientes sobreviven en estado de dependencia física (Durukan and Tatlisumak, 2007). Estos indicadores muestran que la isquemia cerebral representa un gran problema de salud pública tanto en Colombia como para el resto del mundo.

La isquemia cerebral es un ACV generado a partir de la oclusión de una o varias arterias cerebrales, lo que conlleva a una disminución del flujo sanguíneo, ocasionando una depleción de sustratos esenciales tales como la glucosa y el oxígeno en el metabolismo cerebral. Esta oclusión se presenta con mayor frecuencia en la arteria cerebral media (ACM) o en alguna de sus ramificaciones (Wu, 2005; Durukan and Tatlisumak, 2007). La magnitud del daño y su repercusión a nivel estructural y funcional depende del tiempo de oclusión de la arteria y la población neuronal comprometida (Briones et al., 2006; Gao et al., 2005; Hossmann, 2008). Esta enfermedad puede ser generada por factores de riesgo muy comunes como la obesidad, la hipertensión, hiperlipidemia, diabetes y por factores genéticos asociados, así como con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Lo et al., 2003).

Generalmente, existen varias áreas cerebrales más propensas a ser afectadas cuando se genera un evento isquémico. Dentro de estas se encuentran la corteza cerebral, el hipocampo y el putámen caudado (Dirnagl et al., 1999; Gutiérrez-Vargas et al., 2010; Hossmann, 2008; Murphy and Corbett, 2009). El daño ocasionado en todas o algunas de

estas zonas depende del tipo de la isquemia cerebral, la cual puede ser global (afectando zonas cerebrales en un amplio rango) o focal (la cual afecta a una región cerebral específica) mostrando daños que generalmente se manifiestan a nivel clínico por deterioro en la visión, el movimiento del cuerpo, el habla y procesos de aprendizaje y memoria (Khaja and Grotta, 2007; Perel et al., 2007; Sacco et al., 2007).

El hipocampo, ha sido descrito en una gran cantidad de estudios que evidencian sus funciones relacionadas con el aprendizaje y la memoria en varios modelos animales, además de ser un excelente prototipo para estudios de neurofisiología y una de las formas de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP). Por tanto, un daño en esta zona generalmente conlleva a déficits que son claves para la captación de determinada información y posterior evocación de esta en rangos de tiempo considerablemente amplios (Brown and Aggleton, 2001; Jourdain et al., 2002; Calabresi et al., 2003; Briones et al., 2006; Sun et al., 2008). En consecuencia, un daño en el hipocampo genera distintos procesos celulares y moleculares involucrados en procesos anormales que generan la pérdida de la plasticidad sináptica, su potenciación a largo plazo y en consecuencia carencias en el aprendizaje y la memoria (Gao and Xu, 1996; Dirnagl et al., 1999; Calabresi et al., 2003; Stark and Squire, 2003; Hossman, 2008; Gutiérrez-Vargas et al., 2010).

La literatura recoge alrededor de cientos de terapias (invasivas y no invasivas) y de medicamentos evaluados en modelos animales con efecto neuroprotector actuando como “barredores” de radicales libres, antagonistas del calcio e “interruptores” de la cascada isquémica. Sin embargo, en los estudios clínicos la mayoría de estos fármacos no reproducen la propiedad neuroprotectora antes demostrada en animales, incluso algunos han mostrado efectos adversos que previamente no se habían detectado en la experimentación animal. Esto muestra claramente la necesidad del desarrollo de nuevas y apropiadas estrategias neuroprotectoras (Perel et al., 2007; Hossman, 2008).

Las estatinas, cuya función principal es inhibir selectivamente la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la cual participa en la síntesis de

colesterol y derivados isoprenoides (Liao, 2005), han mostrado una fuerte evidencia en disminuir la incidencia de enfermedades cardíacas coronarias (Castilla et al., 2008; Nassief and Marsh, 2008) y tener un efecto protector en el sistema nervioso y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Hoglund and Blennow, 2007; Arvanitakis et al., 2008) e isquemia cerebral (Berger et al, 2008; Van der Most et al., 2009; Céspedes-Rubio et al., 2010; Gutiérrez-Vargas et al., 2010); sin embargo, el mecanismo celular y molecular por el cual estas actúan aún no está completamente determinado (Van der Most et al., 2009). De acuerdo con lo anterior, tanto el uso de medicamentos como modelos animales para el estudio de la lesión cerebrovascular y el desarrollo de estrategias de tratamiento neuroprotector para los pacientes, constituye una cuestión fundamental de relevancia clínica y social.

3. 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El infarto ocasionado por la isquemia cerebral en humanos, normalmente es de tipo focal (Murphy and Corbett, 2009) y está formado por dos zonas características conocidas como el foco isquémico y la zona de penumbra (Mehta et al., 2007). En el foco isquémico se dan procesos de necrosis celular donde es imposible rescatar a las células una vez ha ocurrido el insulto (Mehta et al., 2007). En la zona de penumbra se presenta muerte celular apoptótica, donde es posible rescatar las células de este tejido afectado con una oportuna intervención, (Mehta et al., 2007) y como tal representa un objetivo clave para la intervención terapéutica en isquemia cerebral (Baron et al., 1995); sin embargo, a menos que se mejore la perfusión o que las células se hagan relativamente resistentes a la lesión, las células del área de penumbra sufren el riesgo de morir a las pocas horas por necrosis (Lo, 2008a; 2008b).

En el tejido infartado, se ven afectadas proteínas sinápticas importantes en la integridad neuronal, tales como receptores de glutamato (Dirnagl et al., 1999), proteínas de adhesión sináptica (Costain et al., 2008), proteínas involucradas en procesos de remodelamiento del citoesqueleto (Hoogenraad and Bradke, 2009). Todas estas

proteínas están involucradas en procesos de dendritogénesis, sinaptogénesis y todo lo que enmarca plasticidad sináptica; procesos bastante relevantes que involucran vías de señalización celular y expresión génica diferencial para el aprendizaje y la consolidación de memoria en el caso del hipocampo (Calabresi et al., 2003; Stark and Squire, 2003; Kimura and Matsuki, 2008).

Las estatinas cuya función principal ha sido descrita como inhibidores selectivos de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa han mostrado tener varios efectos pleiotrópicos como promover la angiogénesis (generación de nuevos vasos sanguíneos) y neurogénesis (generación de nuevas células neuronales), donde estas nuevas células migran hacia el hipocampo posibilitando la recuperación en sus diferentes zonas (Liao, 2005; Zhang et al., 2005). De acuerdo con esto es importante determinar el efecto de las estatinas sobre proteínas involucradas en eventos de plasticidad sináptica y que intervienen en procesos de aprendizaje y memoria espacial en ratas, lo cual podría ser un mecanismo celular y bioquímico por el cual las estatinas están llevando a la recuperación tisular, bioquímica y funcional del daño isquémico.

4. JUSTIFICACIÓN

Aunque previos estudios han mostrado que el déficit de memoria y aprendizaje generado después de un evento isquémico en modelos animales, se relaciona con la alteración de proteínas de sinapsis, del citoesqueleto, entre otros. (Calabresi et al., 2003; Kimura and Matsuki, 2008; Stark and Squire, 2003; Costain et al., 2008), con este estudio queremos determinar el papel que puede tener la atorvastatina sobre el mejoramiento de memoria espacial tras un evento isquémico y su relación con proteínas de sinapsis, teniendo en cuenta que dichos fármacos han demostrado disminuir volumen de infarto, contribuir a angiogénesis, neurogénesis y dendritogénesis (Berger et al., 2008; Van der Most et al., 2009) y que muchas terapias en isquemia cerebral muestran resultados alentadores a nivel celular pero cuando se evalúa la función no se tienen muy buenos resultados (Perel et al., 2007).

Es importante resaltar el marco dentro del cual este estudio pretende sugerir una terapia enfocada al uso de la atorvastatina como medida de protección luego de la ocurrencia de un evento isquémico, que pueda solventar los déficits funcionales, tener una consideración mucho más fina del mecanismo por el cual la estatina brinda una recuperación no solamente a nivel celular sino también a nivel funcional y en un futuro extrapolar estos resultados a una terapia en humanos.

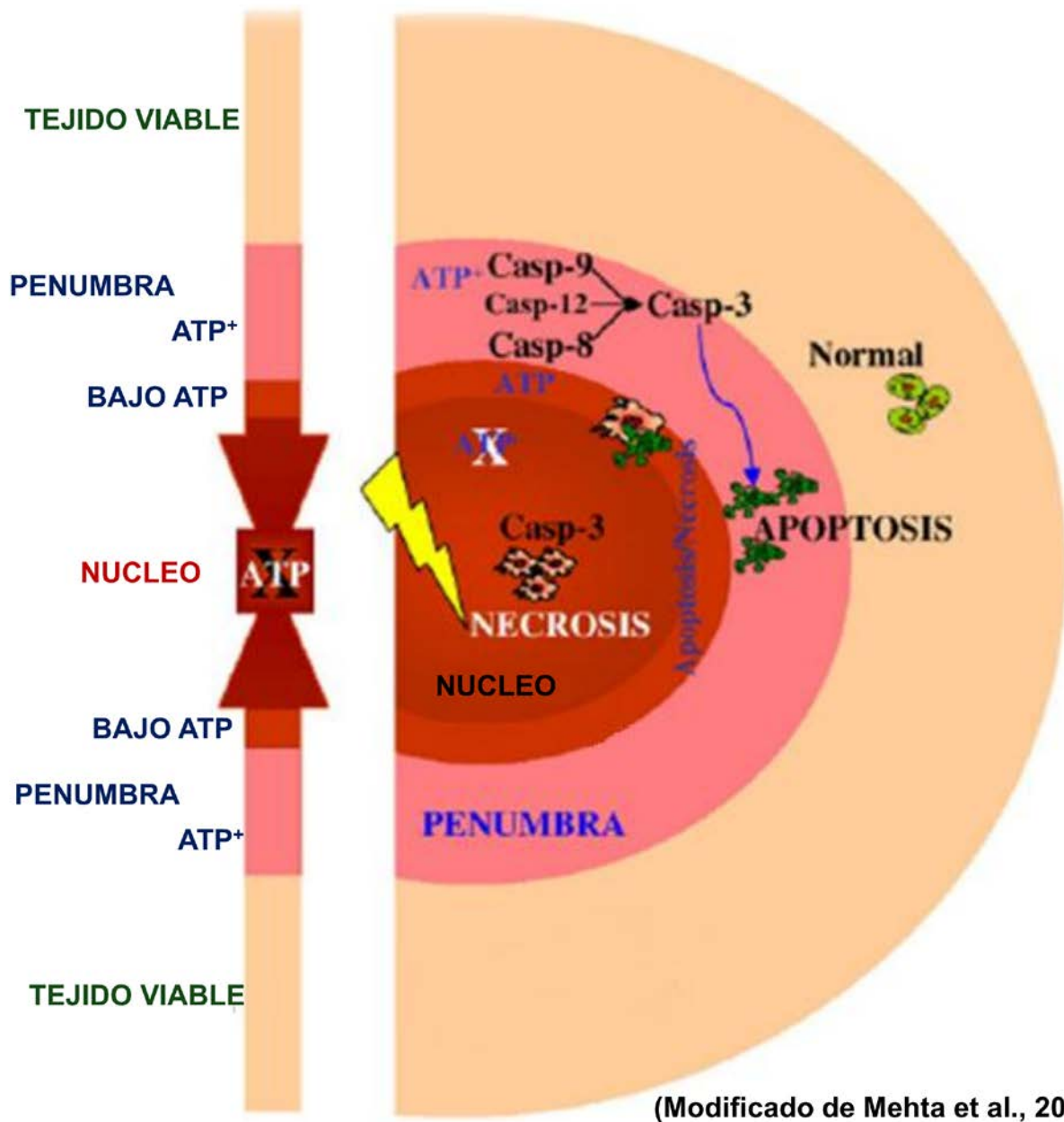
5. MARCO TEÓRICO

5. 1. Isquemia cerebral

La isquemia cerebral es un tipo de accidente cerebrovascular (ACV) generada a partir de la oclusión de una o varias arterias cerebrales, que conlleva a una disminución del flujo sanguíneo, ocasionando una depleción de sustratos esenciales tales como la glucosa y el oxígeno, necesarios para la producción de energía proveniente de la fosforilación oxidativa y mantenimiento de los gradientes iónicos dentro del metabolismo cerebral (Martin, 1994). Esta enfermedad se manifiesta de varias formas dependiendo de la severidad y la magnitud del daño (Tiempo de oclusión de la arteria y población neuronal comprometida) con implicaciones a nivel estructural y funcional (Hou and MacManus, 2002; Gao et al., 2005; Briones et al., 2006; Hossmann, 2008). La isquemia cerebral puede ser generada además por factores de riesgo muy comunes como la obesidad, la hipertensión, hiperlipidemia, diabetes y hasta por factores genéticos asociados además con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Lo et al., 2003).

Generalmente, cuando ha ocurrido un insulto isquémico se generan dos zonas características de lesión. La primera se denomina el foco (núcleo) del daño donde ocurren procesos de necrosis celular y es un área irrecuperable (Mehta et al., 2007). La segunda es contigua al foco isquémico denominada zona de penumbra y es donde ocurren procesos de apoptosis, la cual puede ser recuperable y restablecerse a nivel funcional si se interviene terapéuticamente (Mehta et al., 2007) (Figura 1). La oclusión de la arteria cerebral media (ACM) genera una isquemia cerebral focal: En este modelo se tiene como núcleo isquémico la corteza somatosensorial y como zona de penumbra el hipocampo (Hossman, 2008).

Figura 1. Modelo general que ilustra las dos zonas características generadas luego de una isquemia cerebral.



La isquemia cerebral genera dos zonas características: 1) El núcleo isquémico, donde ocurren procesos de necrosis y no hay suficiente suministro de ATP y 2) La zona de penumbra, donde ocurren procesos de apoptosis y hay niveles de ATP que pueden ayudar a las células a sobrevivir en esta zona (Modificado de Mehta et al., 2007).

5. 1. 1. Excitotoxicidad en isquemia cerebral

La interrupción del suministro de sangre al cerebro durante la isquemia resulta en la privación de oxígeno y de glucosa y por lo tanto, una reducción en la energía disponible para el funcionamiento de las células cerebrales (Dirnagl et al., 1999). Las neuronas en particular, se vuelven incapaces de mantener los gradientes iónicos necesarios para la función celular y la homeostasis (Szydłowska and Tymianski, 2010). Esto se traduce en una excesiva despolarización neuronal, aumento en la liberación de neurotransmisores excitatorios y reducida recaptación de estos neurotransmisores desde el espacio extracelular. Este proceso conduce finalmente a una excesiva acumulación celular de iones y a su vez a la desregulación de varias vías de señalización, activando procesos catabólicos mediados por proteasas, lipasas y nucleasas, que interrumpen la función neuronal y llevan a la muerte celular (Figura 1) (Dirnagl et al., 1999; Szydłowska and Tymianski, 2010).

El glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, ha sido reconocido como potencial neurotóxico desde la década de 1950. Olney acuñó el término "excitotoxicidad" para describir el proceso mediante el cual el glutamato, produce toxicidad (Olney and Sharpe, 1969). La canónica respuesta consiste en que el glutamato se acumula en el espacio extracelular, como consecuencia de la falla de la bomba de iones y déficit energético, así como la insuficiencia de mecanismos de recaptación por parte de células astrocíticas (Choi and Rothman, 1990). Luego de establecidas las cascadas que conducen a la despolarización neuronal, la liberación de glutamato al espacio extracelular neuronal conlleva a una estimulación extensiva de sus receptores lo que puede ser eventualmente tóxico para las neuronas.

El glutamato activa dos tipos de receptores: a) Receptores tipo ionotrópicos como el receptor N-methyl-D-aspartato (NMDAr), el receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPAr), receptores tipo Kainato y b) receptores metabotrópicos tipo mGLUR (de sus siglas en inglés: Metabotropic glutamate receptor) (Lo et al., 2003; Lipton, 2006).

Una sobrecarga de glutamato conduce a la estimulación prolongada de sus receptores, aumentando drásticamente el influjo de calcio (Ca^{2+}), sodio (Na^+) y cloro (Cl^-), y a la salida de iones como el potasio (K^+) y agua en las neuronas (Won et al., 2002). Esto genera un mecanismo de retroalimentación positiva donde los canales de Ca^{2+} presinápticos dependientes de voltaje son activados, liberando aminoácidos excitatorios como el glutamato al espacio extracelular e induciendo al mismo tiempo la activación de sus receptores tipo ionotrópicos y metabotrópicos; lo que da como resultado a que los iones Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- ingresen aún más a la célula induciendo que el K^+ sea liberado al espacio extracelular (Nehls et al., 1989; Katsura et al., 1994; Lerouet et al., 2002; Kimura and Matsuki, 2008). Pese a que el calcio es necesario para el correcto funcionamiento celular y para la supervivencia de las neuronas (Lohmann, 2009; McCue et al., 2010) en muchos estados patológicos incluyendo la isquemia cerebral, los iones Ca^{2+} llegan a niveles críticos que conducen a la muerte celular aguda (Simon et al., 1984).

Esta liberación del glutamato y el K^+ así como el aumento citosólico de los niveles de Ca^{2+} , Na^+ y Cl^- conlleva a una serie de olas de despolarización neuronal en el área de penumbra que conllevan finalmente a la muerte neuronal (Dugan and Choi, 1994; Ladecola, 1997; Fujimura et al., 1998; Kristian and Siesjo, 1998).

5. 1. 2. Homeóstasis neuronal Vs Isquemia cerebral

Las neuronas así como todo tipo de célula, exhiben un patrón característico regulado básicamente por procesos de retroalimentación funcional que conllevan a una homeostasis completa generando una armonía entre la célula y el medio (Pozo and Goda, 2010).

La plasticidad sináptica, la cual es definida como la capacidad neuronal de realizar nuevas conexiones funcionales dependientes de actividad, envuelve una serie de eventos fisiológicos y moleculares complejos en los que se ven involucrados los receptores de glutamato, neurotransmisores como GABA, ON (óxido nítrico) y factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), entre otros (Pozo and

Goda, 2010). También la síntesis, el mantenimiento, estabilidad, y otros eventos de diferentes moléculas de adhesión sináptica y de remodelamiento del citoesqueleto encargadas no solamente de formar las sinapsis, sino también de mantener su estructura, fuerza y funcionalidad a través del tiempo. Este proceso es conocido como potenciación a largo término (LTP) (Bliss and Lømo, 1973) y es en esencia una de las bases para el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Lynch, 2004; Pozo and Goda, 2010).

Sin embargo, la plasticidad sináptica actúa de forma homeostática (plasticidad sináptica homeostática) generando una retroalimentación necesaria para mantener la fuerza y la plasticidad de las sinapsis dentro de un rango dinámicamente funcional (Rabinowitch and Segev, 2006; Pozo and Goda, 2010); actuando incluso a nivel local, o sea, en sinapsis individuales (Rabinowitch and Segev, 2008; Pozo and Goda, 2010). Adicionalmente, el ambiente en el cual se encuentran las neuronas así como su estadio de desarrollo influyen en cómo la plasticidad sináptica homeostática genera una adaptación de estas neuronas a ciertos estímulos o experiencia (Desai et al., 2002; De Simoni et al., 2003; Pozo and Goda, 2010) generando un balance inhibitorio–excitatorio en donde el escalamiento sináptico (procesos de retroalimentación negativa) y la plasticidad sináptica, son regulados en microdominios neuronales (regiones espacialmente muy pequeñas como las espinas dendríticas) (Rabinowitch and Segev, 2008).

Sin embargo, en un evento de isquemia cerebral se genera un desbalance completo de todos los componentes de la red neuronal provocando una muerte inminente de las células que están en el núcleo isquémico y generando mecanismos de apoptosis en las neuronas de la zona de penumbra (Mehta et al., 2007). Como consecuencia, se da una muerte detectable en las zonas afectadas como la corteza somatosensorial y el hipocampo, que se va extendiendo hacia las zonas neuronales que regulan la actividad motora-sensorial y cognitiva del organismo (Murphy and Corbett, 2009). Sin embargo, conforme pasa el tiempo luego del evento isquémico se genera una regulación dada por procesos celulares y moleculares de retroalimentación para tratar de compensar el daño

que se ha generado pero que puede no ser regulada generando incluso conexiones aberrantes (Murphy and Corbett, 2009).

Esto genera que en pacientes que sufren un evento isquémico, la recuperación funcional se exhiba de una forma gradual y lenta por varios e inclusive muchos años (Murphy and Corbett, 2009). Esto se ha visto tanto en humanos como en modelos animales y se ha evidenciado que ocasionalmente se puede llegar a una conclusión en la que se vea que existe una recuperación funcional, una compensación comportamental (dada por la acción efectiva del hemisferio contralateral a la lesión) o ambas, dando finalmente una regulación homeostática completa luego del evento isquémico (Murphy and Corbett, 2009).

5. 2. Proteínas de sinapsis: Papel en plasticidad y su alteración por isquemia cerebral

5. 2. 1. Receptor ionotrópico de glutamato NMDA (N-Metil-D-Aspartato)

Los receptores NMDA constituyen el mayor subtipo de receptores de glutamato dentro de todo el sistema nervioso participando normalmente en transmisiones sinápticas excitatorias rápidas (Madden, 2002; Henson et al., 2010). Estos receptores a su vez poseen una variedad dentro de sus propias subunidades las cuales son NR1, NR2A-D y una identificada como NR3 (Chatterton et al., 2002) la cual también posee un par de variantes hasta ahora descritas NR3A y NR3B (Henson et al., 2010). Cada subunidad se expresa en mayor cantidad dependiendo de la zona cerebral. Sin embargo las subunidades NR1, NR2A y NR2B son consideradas como los mayores tipos funcionales del receptor en todo el sistema nervioso central (SNC) (Figura 2) (Madden, 2002) y la subunidad NR3A la más abundante en los oligodendrocitos (Henson et al., 2010). El receptor NMDA es activado básicamente por dos eventos coincidentes: 1) la unión a los coagonistas de glutamato y glicina y 2) la despolarización simultánea de la membrana celular la cual remueve el Mg^{2+} , que está bloqueando el poro del canal del receptor,

llevando al influjo intracelular de Ca^{2+} . Esta activación en condiciones fisiológicas es regulada por un proceso de retroalimentación positiva donde el propio flujo de Ca^{2+} induce el bloqueo del receptor impidiendo así su excesiva concentración intracelular. Pero en condiciones patológicas se da una retroalimentación negativa donde el flujo de este ión no es controlado, llevando a excesivas concentraciones intracelulares de este (Krupp et al., 1999; Lo et al., 2003; Wang et al., 2003; Christie and Jahr, 2008).

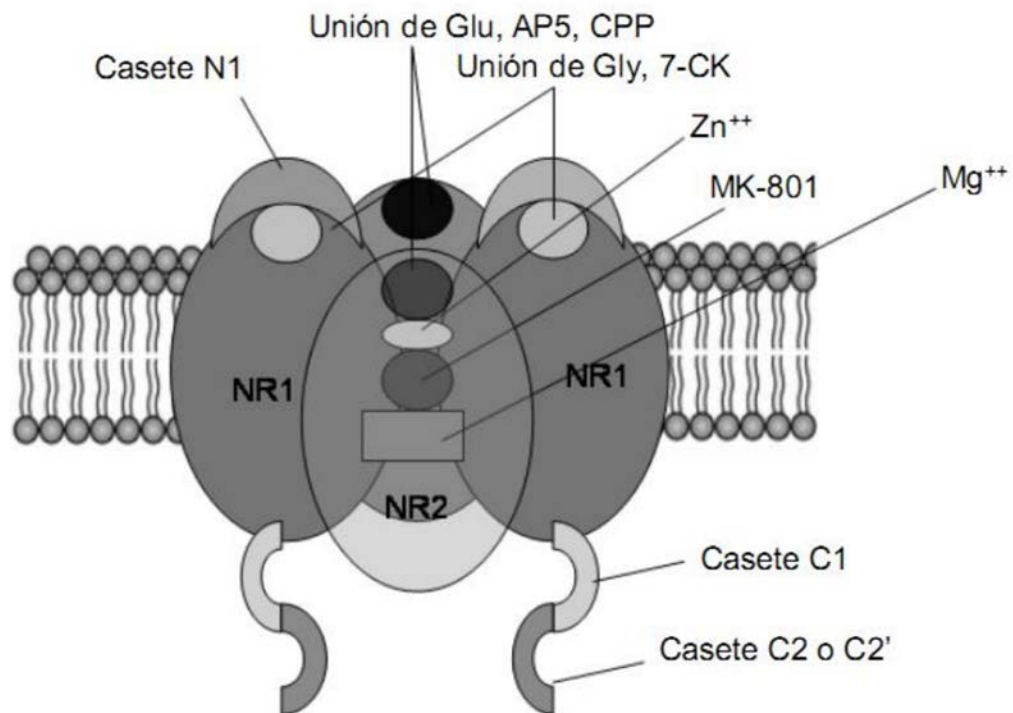
Las subunidades de los receptores NMDA han mostrado jugar un papel muy importante dentro procesos celulares como la sinaptogénesis así como en la plasticidad sináptica (Henson et al., 2010). Los receptores NMDA en el hipocampo también mantienen una correcta actividad en condiciones basales por fosforilaciones dadas por proteína quinasa A (PKA) jugando un papel clave en la plasticidad sináptica y además se ha evidenciado que subunidades como NR2B pueden controlar la cinética de estos receptores incluyendo su activación, probabilidad de apertura y cierre (Erreger et al., 2005).

La subunidad NR1, es la subunidad estructural del NMDAr, ya que se ha evidenciado que ninguna de las subunidades NR2 y NR3 es capaz de formar un receptor de manera funcional (Hollmann and Heinemann, 1994). La subunidad NR2A por su parte, se ha visto muy relacionada con el estado de maduración de las sinapsis, presentándose en mayor cantidad en sinapsis maduras, así como en la eficacia de la transmisión de las corrientes sinápticas mediadas por NMDA (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005). Por su parte, la subunidad NR2B se ha visto muy incrementada en los primeros estadios del desarrollo, disminuyendo conforme el organismo madura (Henson et al., 2010). También se ha evidenciado que esta subunidad está involucrada en procesos de plasticidad sináptica y LTP en hipocampo (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Andersen et al., 2007). Estas propiedades de los receptores ionotrópicos NMDA producen diferentes efectos a niveles postsinápticos en cuanto a perfiles diferenciales en vías de señalización, las cuales contribuyen a una correcta transmisión sináptica y plasticidad (Erreger et al., 2005; Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Andersen et al., 2007).

Los NMDAr son mediadores esenciales de la plasticidad sináptica regulando aspectos del desarrollo y transmisión de las sinapsis (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005). Sin embargo excesivamente activados pueden causar la muerte celular en diferentes escenarios neuropatológicos (Arundine et al., 2004). Específicamente, en un evento de excitotoxicidad por glutamato la cantidad disponible de las subunidades del receptor NMDA varían dependiendo de la edad del individuo y de la región cerebral en particular incrementando la subunidad NR2B en la corteza cerebral y el hipocampo (Montori et al., 2010).

Esta subunidad NR2B a pesar de estar muy relacionada con el estado de maduración de la sinapsis y en plasticidad sináptica (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Henson et al., 2010) juega un papel dual en eventos de isquemia cerebral o excitotoxicidad por glutamato. Los receptores NMDA extrasinápticos que contienen la subunidad NR2B normalmente se encuentran asociados e inhibiendo al complejo de señalización de muerte (DSC). Cuando se generan procesos de despolarización neuronal dado por la excitotoxicidad estos receptores se sobreactivan incrementando el influjo de Ca^{2+} provocando la activación de la quinasa de la proteína asociada a muerte (DAPK), que a su vez fosforila al receptor NMDA en el residuo Serina 1303 (S¹³⁰³) lo que genera que el complejo DSC se libere y active las rutas de señalización de muerte celular (Martin and Wang, 2010).

Figura 2. Estructura común del receptor NMDA.



Los receptores NMDA están formados por cuatro subunidades, dos del tipo N1 y dos NR2 y/o NR3. El glutamato, así como los agonistas (Glicina y D-Serina) y antagonistas (MK-801) del receptor se unen en un residuo de la subunidad NR2. Los sitios de unión al Mg⁺⁺ y Zn⁺⁺ residen en el interior del canal (Tomado de Rivera-Lee y López-Colome, 2005).

La localización del receptor en sinapsis depende de una serie de interacciones con diferentes tipos de proteínas (Wenthold et al., 2003). Un grupo de proteínas que se une directamente a receptores NMDA y que son componentes abundantes de las densidades post-sinápticas (PSD), son la familia de proteínas guanilato-quinasa asociadas a membrana (MAGUKs), de las cuales la proteína de densidad post-sináptica 95 (PSD-95), la proteína de densidad postsináptica 93 (PSD-93), la proteína asociada a sinapsis 97 (SAP97) y la SAP102 se encuentran ampliamente caracterizadas (Kornau et al., 1995). Estas proteínas tienen tres dominios: Un dominio

GK (Guanilato quinasa), un dominio SH3 (Src-homology-3), y un último dominio PDZ (PSD-95/Dlg/ZO1) a través del cual se asocian a receptores NMDA, actuando como proteínas de andamio (Sheng and Sala, 2001).

En un modelo de excitotoxicidad, la excesiva activación de NMDA-NR2B lleva a un incremento de calcio intracelular, lo cual resulta en la activación de la calpaína, una proteasa importante mediadora de la toxicidad celular (Simpkins et al., 2003; Gascon et al., 2008). Esta proteasa corta eficientemente la región C-terminal de la subunidad NR2A y NR2B, produciendo subunidades que carecen de secuencias importantes para la formación de complejos de señalización en la membrana post-sináptica (Guttmann, et al., 2001). El resultado final es el desacople de los receptores NMDA con proteínas de andamio como PSD-95, afectando la organización estructural de la PSD, lo cual tiene un gran impacto sobre las funciones sinápticas acopladas a receptores NMDA (Gascon et al., 2008).

5. 2 .2. Proteína post-sináptica 95 (PSD-95)

La proteína postsináptica 95 (PSD-95) es una de las proteínas tipo MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) (Chen et al., 2000) con múltiples dominios de interacción proteína-proteína, la cual se encuentra en mayor cantidad en las densidades postsinápticas (PSD) que regulan de manera crítica de la estabilización y/o liberación de varios tipos de receptores y diferentes tipos de proteínas en la sinapsis entre ellas el receptor NMDA (Schluter et al., 2006; Kornau et al., 1995).

PSD-95 posee diversas funciones sinápticas. Una de esas funciones es interactuar con proteínas de membrana y regular su localización sináptica. Esta estabiliza proteínas de membrana interactuando en las sinapsis y suprimiendo su difusión lateral o internalización (Roche et al., 2001; Prybylowski et al., 2005; Bats et al., 2007). Además de su papel en el tráfico de proteínas de sinapsis, PSD-95 puede regular las propiedades funcionales de las proteínas de membrana con las que interactúa, esto evidenciado en estudios donde existen cambios en el bloqueo de los receptores NMDA dependiente de PSD-95 (Lin et al., 2006).

Así mismo, PSD-95 incrementa la incorporación en sinapsis de los AMPAr en neuronas corticales e hipocampales, por ende generando un incremento del LTP dependiente de los receptores NMDA (Beique and Andrade, 2003; Stein, 2003).

En nuestro grupo de investigación se ha encontrado que después de una isquemia cerebral disminuye PSD-95, lo cual indica pérdida de la estabilidad de proteínas de sinapsis, apoyado con una pérdida de asociación con subunidades de receptores NMDA y AMPA (NR2B y GluR2/3 respectivamente) (Gutiérrez-Vargas et al., en preparación).

5. 3. Factores tróficos e isquemia cerebral

Los factores tróficos o factores de crecimiento, son proteínas o péptidos que son sintetizados naturalmente por los organismos, cuya función principal es estimular el crecimiento, madurez y sobrevivencia de las células y están involucrados en otros tipos de eventos celulares y fisiológicos. Entre los más conocidos están el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), la proteína morfogenética del hueso (BMP), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otros (Baird, 1993). En el sistema nervioso se han caracterizado ampliamente el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Patterson and Nawa, 1993; Cunha et al., 2010).

En isquemia cerebral, se ha visto que los factores tróficos juegan un papel muy importante como agentes protectores dentro del sistema nervioso, modificando la respuesta de muerte neuronal a través de la activación de vías de supervivencia y diferenciación neuronal (Yuen and Mobley, 1996).

5. 3. 1. Factor Neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

El BDNF, es una proteína que normalmente es sintetizada como una molécula inmadura (pre-proBDNF) la cual es clivada en el retículo endoplasmático en una molécula de 32 KDa (proBDNF), y finalmente es transformado en una molécula de 14KDa luego de un segundo corte (BDNF maduro) (Lessmann et al., 2003; Cunha et al., 2010). El BDNF es una molécula que se libera al sistema nervioso en una forma dependiente de actividad y su localización intracelular es normalmente somatodendrítica aunque muchas veces se encuentra en dendritas (Yang et al., 2009; Cunha et al., 2010)

El BDNF se une y activa dos tipos de receptores a nivel pre y post-sináptico, estos son los receptores TrkB (receptor quinasa relacionada con tropomiosina) a los cuales se une con alta afinidad y los receptores $p75^{NTR}$ por los cuales tiene menor afinidad. Normalmente, su actividad ha sido muy relacionada a través de la activación del receptor TrkB generando la activación de vías de señalización que involucran moléculas como fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), miembros de la familia de la quinasa de la proteína activada por mitogeno (MAPK), el factor de transcripción CREB, el blanco de rapamicina de mamífero (mTOR) entre otras. Moléculas muy asociadas con el mantenimiento de la supervivencia, la proliferación celular y la regulación post-traducciona de proteínas implicadas en la homeostasis celular (Cunha et al., 2010). La activación e interacción de estas proteínas también genera que se activen diferentes canales iónicos para Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y la fosforilación de los receptores NMDA en una vía dependiente de Fyn (proto-oncogen tirosina quinasa), potenciando la transmisión glutamatérgica resultando en despolarizaciones que contribuyen y facilitan el LTP (Cunha et al., 2010)

El BDNF se ha visto ser una molécula neuroprotectora en eventos de isquemia cerebral mediante la regulación corriente arriba de los receptores TrkB y proteínas pro y antiapoptóticas como Bax y Bcl-2 respectivamente así como la modulación de las

sinapsis glutamatérgicas en la zona de penumbra (Zhang and Pardidge, 2001; Mehta et al., 2007).

5. 4. Hipocampo, aprendizaje y memoria espacial

El hipocampo, es una estructura dividida en cuatro regiones denominadas CA1, CA2, CA3 y giro dentado (Ver Figura 3). Este juega un papel importante en la formación de varios tipos de memoria como la memoria declarativa (memoria a largo plazo que puede ser conscientemente traída con los hechos y los eventos pasados) (Squire et al., 2004), así como la memoria espacial (la cual trae a colación mapas cognitivos y su uso en la navegación a través del espacio (Burgess et al., 2002) (Ver Figura 4).

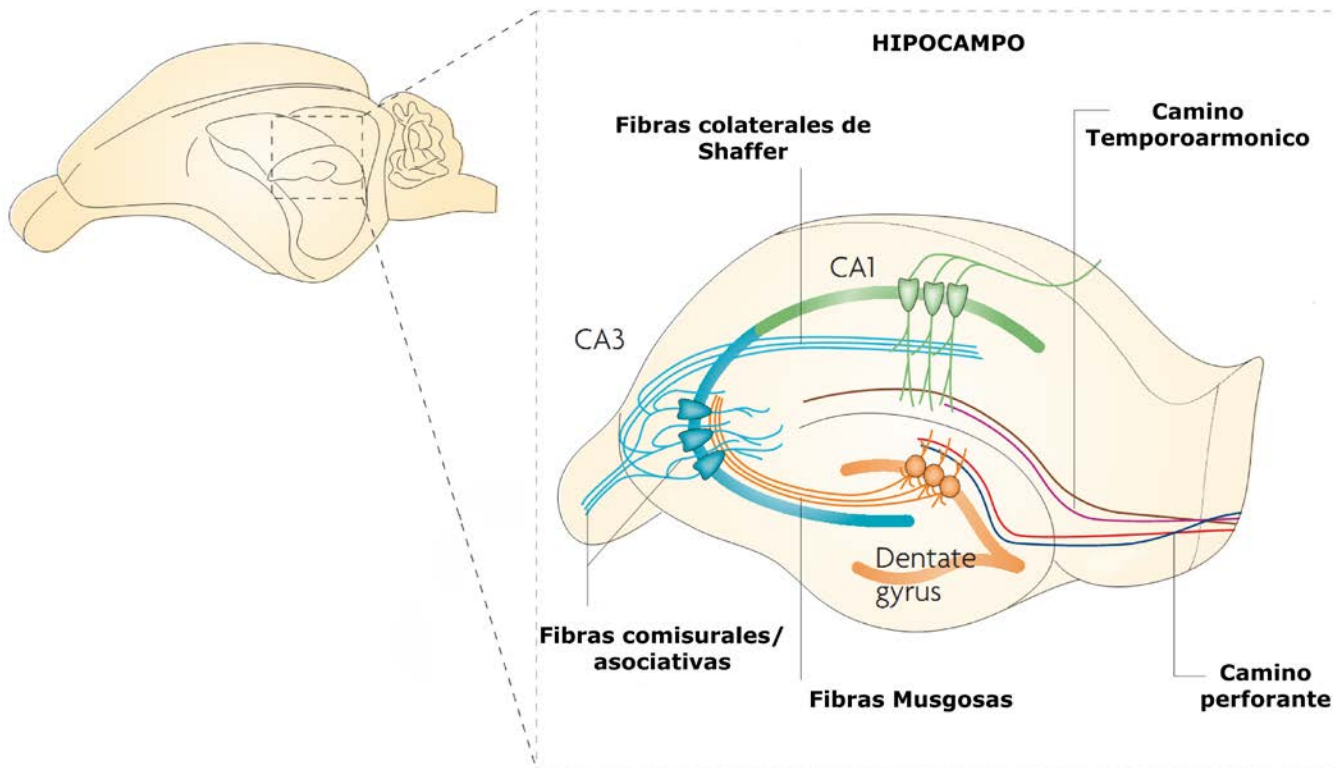
De todas las propiedades de las sinapsis hipocampales, la habilidad de responder a patrones específicos de activación con un incremento de larga duración (LTP) o disminución en la eficacia sináptica (LTD) genera que estas se puedan modular por la actividad y por una amplia red de neuromoduladores (NMDA, glutamato, entre otros) y proteínas (como dominios PDZ, activadores de la proteína quinasa A, PKA, AMPAr, NMDAr, etc.) actuando en las neuronas pre o post-sinápticas (Andersen et al., 2007; Cunha et al., 2010).

Ya que el glutamato es el neurotransmisor por excelencia de las sinapsis excitatorias rápidas, estas propiedades promueven que los receptores ionotrópicos como NMDA tengan un papel clave en procesos de LTP y formación de la memoria en el hipocampo (Pérez-Otaño and Ehlers, 2005; Andersen et al., 2007).

La plasticidad sináptica muestra entonces que, gracias a diferentes tipos de proteínas de adhesión (Salinas and Price, 2005), de remodelamiento de citoesqueleto (Anastasiadis, 2007; Curtis de, 2007; Hoogenraad and Bradke, 2009), receptores de glutamato (Geiger et al., 1995; Ladecola, 1997; Erreger et al., 2005), quinasas y fosfatasas (Wang, et al., 2003; Jung et al., 2004; Cunha et al., 2010) se pueden

favorecer los mecanismos que subyacen al aprendizaje y memoria espacial dentro del hipocampo (Lynch, 2004).

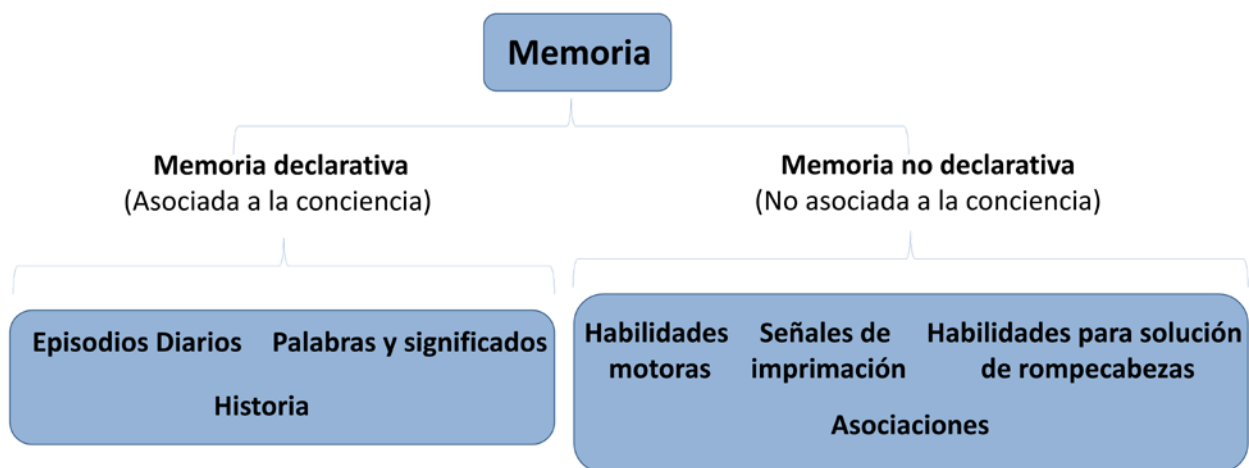
Figura 3. Anatomía básica del hipocampo.



El hipocampo y sus cuatro zonas características: las regiones CA1, CA2, CA3, y el giro dentado poseen diferentes tipos de fibras nerviosas que inervan las diferentes zonas desde el hipocampo y hacia otras zonas cerebrales. Estas fibras conectan para generar diferentes tipos de comportamientos, entre ellos el aprendizaje y memoria espacial (Modificado de Murphy and Corbett, 2010).

Todas estas teorías hacen predicciones muy probables acerca de cómo la actividad celular funciona durante la navegación espacial y la memoria declarativa y el impacto de lo que un daño hipocampal sobre esta estructura generaría en este tipo de memorias. Esto se ha evidenciado en isquemia cerebral donde un incremento extracelular en los niveles de glutamato e intracelular de Ca^{2+} producen un completo desequilibrio en vías de señalización (Krupp et al., 1999; Calabresi et al., 2003; Lo et al., 2003; Wang et al., 2003; Jung et al., 2004; Berberich et al., 2006; Hossman, 2008) conduciendo a la muerte celular y a la disfunción de la actividad hipocampal cuando no hay un mecanismo que induzca una protección frente a estos factores (Lo et al., 2003; Lynch, 2004).

Figura 4. Categorías cualitativas de la memoria.



La memoria posee dos grandes tipos de jerarquías dependiendo del tipo de asociación que tenga con la conciencia del individuo: La memoria declarativa se asocia a la conciencia y trae recuerdos dados por episodios, la historia, palabras y significados. La memoria no declarativa no se asocia a la conciencia y trae a colación cualidades como las habilidades motoras, las asociaciones de las cosas, entre otras (Modificado de Dale Purves et al., 2008).

5. 5. Neuroprotección en isquemia cerebral

La neuroprotección en isquemia cerebral se ha dirigido a diferentes tipos de métodos hacia blancos proteicos y génicos que en su momento se han visto ser prometedores como tratamiento. Estos tratamientos se han visto muy enfocados en diferentes ventanas temporales después de ocurrido el evento isquémico y donde actúan diferentes protagonistas característicos como el Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , moléculas de estrés oxidativo como los radicales libres, el óxido nítrico, el glutamato, proteínas de adhesión celular así como ciertas moléculas pro y antiapoptóticas (Mehta et al., 2007).

Todo esto ha llevado al desarrollo de diferentes fármacos como el MK-801 (inhibidor de NMDAr), el YM-872 (inhibidor de AMPAr), clomethiazole (agonista de GABA), entre otros. Sin embargo, el tratamiento con estos tipos de fármacos no ha podido reproducir buenos efectos en pacientes que han sufrido un evento isquémico, ya que las concentraciones de las drogas y los tiempos de administración de estas no han podido reproducir una terapia neuronal efectiva (Ginsberg, 2008).

5. 5. 1. Estatinas

La necesidad de establecer una estrategia de protección eficaz ha incluido en un rango considerable de estudios a las estatinas, quienes son inhibidoras selectivas de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa la cual participa directamente en la producción de L-mevalonato dentro de la ruta de síntesis de colesterol y derivados isoprenoides en el hígado (Liao, 2002).

Fuera de su uso convencional en la reducción del colesterol, las estatinas han sido ampliamente utilizadas en muchas otras aplicaciones clínicas, como en accidentes cerebrovasculares (Ovbiagele et al., 2007), trauma craneoencefálico (Wang et al., 2007), enfermedad de Alzheimer (Lo et al., 2003), y la enfermedad de Parkinson (Hernandez-Romero et al., 2008). Esto gracias a que las estatinas ejercen

neuroprotección a través de diferentes efectos independientes a la reducción en la síntesis del colesterol, denominados *efectos pleiotrópicos*. Por la inhibición de la conversión de HMG-CoA a L-mevalonato, las estatinas bloquean la síntesis de importantes isoprenoides, tales como el farnesilpírofosfato (FPP) y geranilgeranilpírofosfato (GGPP), los cuales son intermediarios importantes para la modificación post-traducciona de las RhoGTPasas (RhoA, Rac, y Cdc42) (Wang et al., 2008) (Figura 5).

5. 5. 1. 1. Efectos pleiotrópicos de la estatinas en isquemia cerebral

El tratamiento con estatinas ha demostrado incrementar la neurogénesis y sinaptogénesis sin alteran los niveles de colesterol (Chen et al., 2003, 2005; Lu et al., 2004, 2007). También se ha evidenciado que las estatinas inducen neuroprotección por la liberación de factores tróficos como el BDNF (Wu et al., 2008). Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que estas inducen la activación de vías de supervivencia a través de proteína quinasa B (PKB/Akt) (Kureishi et al., 2000; Dimmeler et al., 2001) la cual puede tener efectos neuroprotectores inclusive en la enfermedad de Alzheimer donde se ha visto que las estatinas inhiben a la quinasa de la sintasa de glicógeno 3 β (GSK-3 β) disminuyendo el β -amiloide (Jope et al., 2007; Salins et al., 2007).

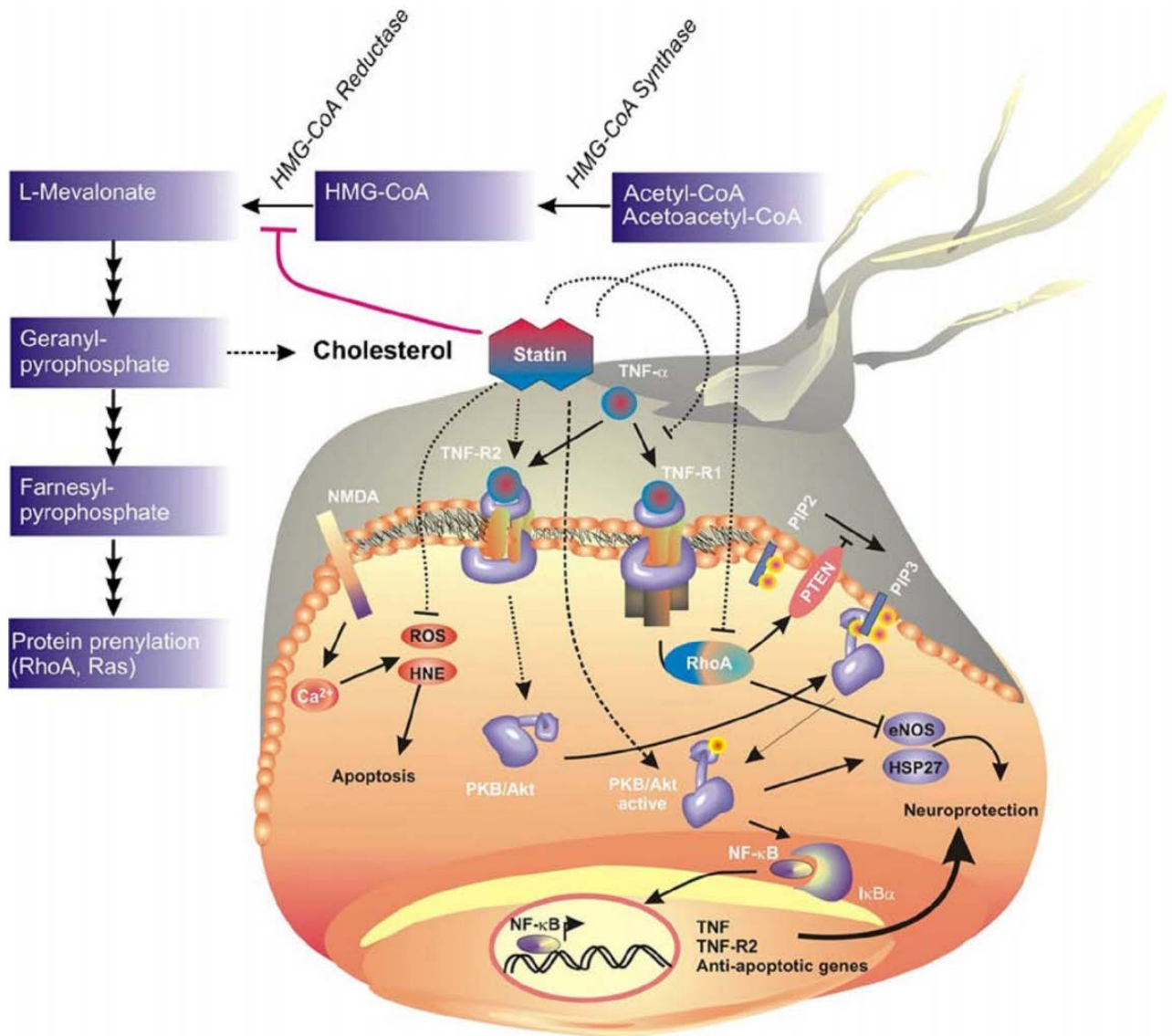
Las estatinas han mostrado tener efectos benéficos a nivel fisiológico a través de la producción del óxido nítrico (ON) por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que a su vez es activada por GSK-3 β , lo cual genera que haya una vasodilatación y se activen vías de señalización de supervivencia en el sistema vascular (Kureishi et al., 2000; Eggermont et al., 2006).

Estudios realizados en nuestro grupo de investigación nos han permitido concluir en un modelo de isquemia cerebral focal en rata, que el pos-tratamiento con atorvastatina reduce el volumen de infarto hasta un 60% a las 24 horas post-isquemia, con un significativo bloqueo de la pérdida neuronal, disminución de marcadores de neurodegeneración, además de favorecer la recuperación de procesos neuríticos en

cultivos primarios de corteza cerebral alterados tras un estímulo excitotóxico con glutamato (Céspedes-Rubio et al., 2010).

Ante la ventaja terapéutica que esto implica y al poco conocimiento de la acción de las estatinas en reparación cerebral, es necesario profundizar en los efectos bioquímicos y tisulares, además de evaluar el efecto funcional de estos fármacos sobre la sinapsis.

Figura 5. Esquema representativo del efecto de las estatinas sobre el metabolismo de lípidos y sus efectos.



El efecto pleiotrópico de las estatinas se manifiesta a través de diferentes vías de señalización hasta ahora caracterizadas. Estas vías implican moléculas tan importantes como PKB/Akt, el ON, Rho GTPasas, receptores de TNF y factores de transcripción como NF-κβ (Tomado de Van der Most et al., 2009).

6. HIPÓTESIS

6. 1.

- **H₀**: El tratamiento con atorvastatina no mejora el déficit de aprendizaje y memoria espacial en ratas con isquemia cerebral focal transitoria.
- **H₁**: El tratamiento con atorvastatina mejora el déficit de aprendizaje y memoria espacial en ratas con isquemia cerebral focal transitoria.

6. 2.

- **H₀**: El tratamiento con atorvastatina no restaura complejos moleculares sinápticos (NR2B/PSD-95) y niveles de BDNF luego de una isquemia cerebral focal.
- **H₁**: El tratamiento con atorvastatina restaura complejos moleculares sinápticos (NR2B/PSD-95) y niveles de BDNF luego de una isquemia cerebral focal.

7. OBJETIVOS

7. 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto neuroprotector de la atorvastatina sobre proteínas implicadas en plasticidad sináptica y procesos de aprendizaje y memoria espacial en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata.

7. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el aprendizaje y memoria espacial mediante el laberinto acuático de Morris en animales isquémicos tratados con atorvastatina
2. Evaluar la población neuronal y neurodegeneración 12 días post-isquemia en las áreas de lesión generadas en ratas isquémicas tratadas con atorvastatina.
3. Evaluar el efecto celular y bioquímico de la atorvastatina sobre proteínas implicadas en sobrevivencia y plasticidad neuronal (BDNF, PSD-95, NR2B, MAP-2) en ratas con isquemia cerebral focal transitoria.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8. 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este trabajo se utilizó un total de 40 ratas Wistar macho, debido a que los cambios hormonales en las ratas hembras producen variabilidad en estudios de neuroprotección luego de una isquemia cerebral (Wappler et al., 2010). Las ratas Wistar “*Rattus norvegicus albinus*” utilizadas provienen de una colonia exogámica, criadas en condiciones SPF (Specific Pathogen Free) en el bioterio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia. Los animales estuvieron alojados en cajas de policarbonato, en grupos de máximo cinco animales por caja, donde recibieron agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron manipulados de acuerdo con las normativas de protección animal en Colombia (Ley 84 de 1989 y resolución 8430 de 1993), teniendo especial cuidado en minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales empleados. Además, el proyecto cumplió con los lineamientos establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia. Los animales usados fueron adultos jóvenes de 8 semanas de edad, con peso (350g) y talla homogénea en el experimento.

8. 2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO, TRATAMIENTO CON ATORVASTATINA

La realización de las cirugías se llevó a cabo en el área de experimentación del Grupo de Neurociencias de Antioquia en el bioterio SPF de la sede de investigación universitaria (SIU). Las 40 ratas inicialmente se seleccionaron aleatoriamente en 4 grupos experimentales cada uno con un n=10 individuos (ver tabla 1) de la siguiente manera:

El primer grupo fueron animales control SHAM-PLACEBO (SP): Se les realizó una incisión a nivel del cuello exponiendo las dos arterias carótidas comunes donde la derecha fue ocluida 15 minutos con una pinza vascular. Luego de esto, se liberó la pinza para que hubiese reperfusión (Animales control). Los animales recibieron un

placebo vía oral a través de sonda esofágica, carboximetilcelulosa a una concentración de 10mg/Kg de peso.

El segundo grupo fueron animales SHAM-ATORVASTATINA (SA), los cuales corresponden a animales control tratados vía oral con atorvastatina a una concentración de 10mg/Kg de peso.

El tercer grupo, animales ISQUEMIA-PLACEBO (IP). A estos animales se les indujo una isquemia focal llevada a cabo mediante el modelo de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO), adaptada de previos estudios (Gutiérrez-Vargas et al., 2010) e implementando ligeras modificaciones para optimizar el procedimiento. La arteria carótida común derecha (ACC) fue expuesta y aislada cuidadosamente del nervio vago (NV); también la arteria carótida externa derecha (ACE) y la arteria carótida interna derecha (ACI) fueron expuestas y aisladas. Las arterias faríngea ascendente, tiroidea superior y occipital, ramas de la ACE fueron cauterizadas por electrocoagulación (AARON® bipolar cautery). La arteria pterigopalatina, primera rama de la ACI fue aislada. La porción distal de la ACE fue ligada con nylon 6/0 y cortada. Un nylon monofilamento 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, USA) previamente redondeado en uno de sus extremos mediante flameado y recubierto con una solución de poli-L-Lisina (0.1% [wt/vol]) en agua desionizada; Sigma), fue insertado desde la ACE hacia la ACI para ocluir la ACM y su origen, avanzando 17-19 milímetros. Posteriormente, se verifico que el monofilamento no hubiese quedado dentro de la arteria pterigopalatina. La incisión fue suturada dejando protruir 1 cm. el monofilamento. Después de 60 minutos, el nylon fue removido permitiendo la reperusión. Estos animales recibieron la carboximetilcelulosa (10mg/Kg de peso) como placebo (Figura 6).

El cuarto grupo ISQUEMIA-ATORVASTATINA (IA), fueron animales a los cuales se les indujo la isquemia tal y como se describió anteriormente (Figura 6) y tratados vía oral con atorvastatina (10mg/Kg de peso) ya que estudios anteriores en el laboratorio de Neurociencias de Antioquia han mostrado resultados promisorios con esta concentración (Céspedes-Rubio et al., 2010; Gutiérrez-Vargas et al., 2010).

Todos los animales se sometieron a la respectiva intervención quirúrgica bajo anestesia con una mezcla de ketamina (60 mg/kg)/ xilacina (5 mg/kg) inyectada intraperitonealmente y atropina (0.1 mg /kg) vía subcutánea; posteriormente las ratas recibieron una mezcla de 2-4% de isoflurano y 96% de oxígeno a través de una máquina de anestesia inhalatoria (VMC TM Table top gas Anesthesia Instrument) como mantenimiento. Al finalizar la cirugía, cada animal fue trasladado a una manta de calentamiento a 37°C para evitar que entraran en hipotermia (Céspedes-Rubio et al., 2010; Gutiérrez-Vargas et al., 2010).

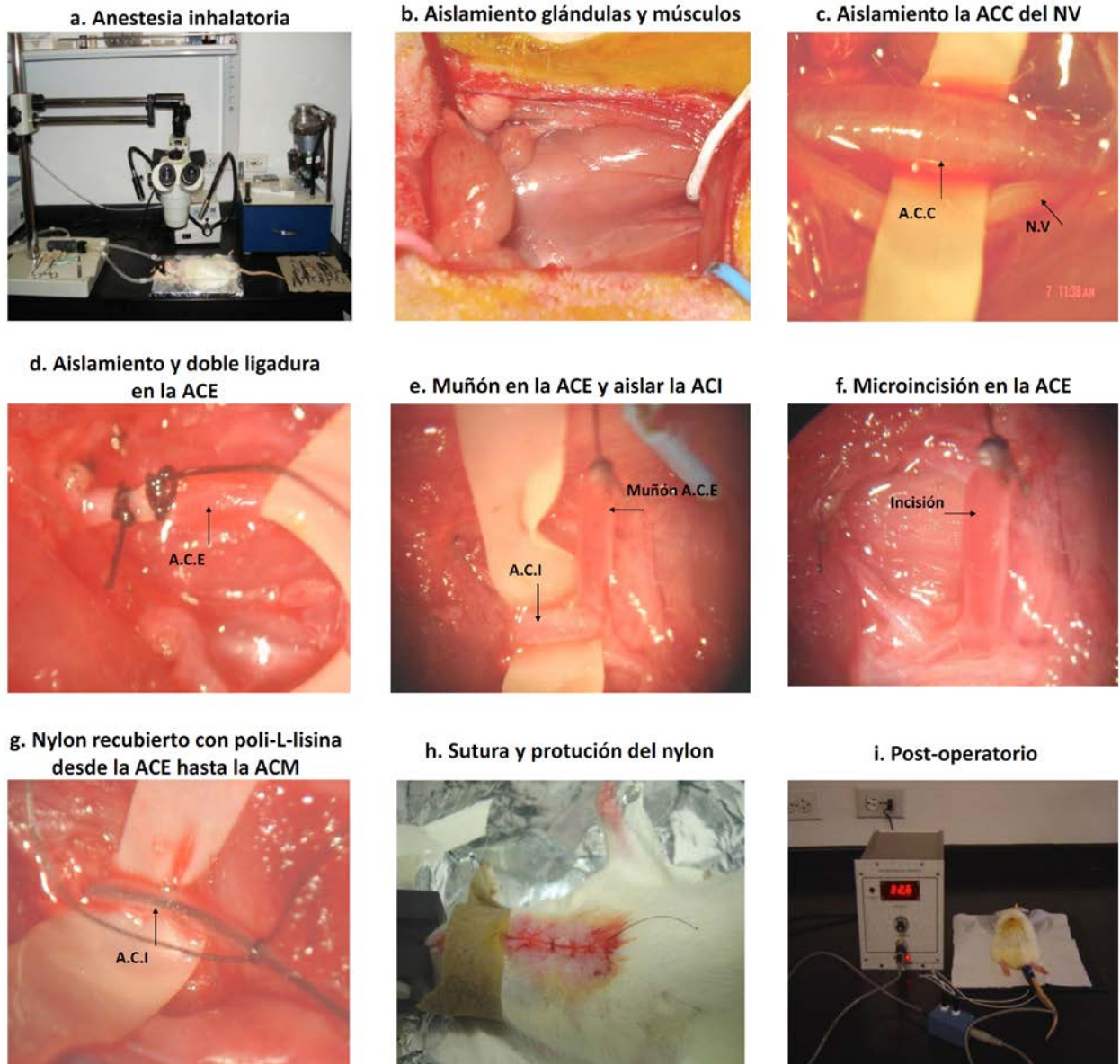
Seis horas post-cirugía, todos los animales (SP, SA, IP e IA) recibieron la primera dosis de atorvastatina cálcica (Lipitor [®] – Pfizer) o del placebo, según correspondiera. La dosificación se mantuvo hasta las 72 horas, administrando una dosis diaria.

Tabla 1: Número de animales que se utilizó para cada tratamiento.

TRATAMIENTO	Sham placebo	Sham Atorvastatina	Isquemia Placebo	Isquemia Atorvastatina
NÚMERO DE ANIMALES	10	10	10	10

Figura 6. Modelo de isquemia cerebral focal transitoria a partir de la implementación de t-MCAO.

Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO)



Metodología implementada para la oclusión de la arteria cerebral media.

Área de neurobiología celular y molecular. Grupo de Neurociencias de Antioquia.

8. 3. EVALUACIÓN NEUROLÓGICA

Seis horas después de la cirugía se realizó la primera evaluación neurológica de siete puntos (de 0 a 6) a todos los animales (Yrjanheikki, J. et al.,2005) para valorar el déficit neurológico post-isquemia. Los puntajes con sus respectivas valoraciones se describen en la Tabla 2

Esta evaluación se siguió realizando todos los días hasta el día anterior de inicio del laberinto acuático de Morris (día 6 post-isquemia).

Tabla 2: Niveles de puntuación de la evaluación neurológica respecto a los diferentes tipos de movimiento a partir de las 6 horas post-isquemia (Yrjänheikki et al.; 2005).

PUNTUACIÓN	DESCRIPCIÓN
0	Ningún movimiento espontáneo
1	Ciclando de forma espontánea hacia el lado parésico
2	Dando vueltas hacia el lado parésico cuando son halados por la cola
3	Dando vueltas hacia el lado parésico si se tira y se levanta por la cola
4	Resistencia reducida de empuje lateral hacia el lado parésico
5	Flexión constante de la extremidad anterior contralateral al hemisferio lesionado
6	Extensión normal de las dos patas delanteras hacia el suelo cuando se levanta

8. 4. LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

La evaluación comportamental de los animales fue realizada por medio del laberinto acuático de Morris (D'Hooge and De Deyn, 2001; Morris, 1984; Vorhees and Williams, 2006) con algunas modificaciones teniendo en cuenta la necesidad de ajustar la evaluación al modelo de isquemia implementado.

Inicialmente todos los animales se acondicionaron a la presencia y olor del experimentador 7 días antes de la prueba (7 días post-isquemia), 30 segundos por animal, para garantizar un mejor reconocimiento por parte de estos y evitar al máximo los niveles de estrés. Aunque este no logra impactar negativamente el desarrollo adecuado de la medición, además de que en el diseño experimental se cuenta con un grupo control de referencia en la fase de entrenamiento (Ver nota 1).

NOTA1: Vale aclarar además de esto, que las variables como el olor fueron controladas mediante una exhaustiva limpieza de la sala de experimentación antes de la prueba y que el olor del experimentador se mantuvo de una forma neutra para que este no influyera sobre el comportamiento del animal.

Posteriormente, se utilizó una piscina completamente negra y esférica de 2m de diámetro y 0.6m de profundidad en la cual se colocó una plataforma del mismo color de 10cm de diámetro y 48 cm de largo en uno de los cuadrantes de la piscina (la parte sur-oeste). Luego, se marcaron los 4 puntos cardinales (N, S, E, O), se registró el movimiento de los animales a través de una video cámara y los datos (Tiempo de latencia de llegada a la plataforma, y distancia) fueron registrados a través del software VIDEOTRACK v3 Automated Behavioral Analysis (ViewPoint Life Sciences).

El protocolo consistió de tres fases fundamentales:

- Aprendizaje: primera fase de la prueba con 2 entrenamientos diarios, consistente en accesos aleatorios por los 4 puntos cardinales, terminando solo cuando el promedio general de los animales estuvo por debajo de 20 segundos de latencia.

- Retención: Segunda fase, la cual es sin la presencia de la plataforma y mide durante 60 segundos el número de veces que el animal cruza por el sitio donde estaba previamente la plataforma. En esta prueba, se considera en el software la zona donde inicialmente estuvo la plataforma y además se hacen tres ampliaciones consecutivas de esta, dando como resultado una zona dos veces más grande (2x), tres veces más grande (3x), y cuatro veces más grande (4x) que la zona original. Esto con la intención de monitorear las áreas más afines para los animales y ver cuál es la tendencia de estos de dirigirse hacia donde inicialmente estaba la plataforma (Figura 7).

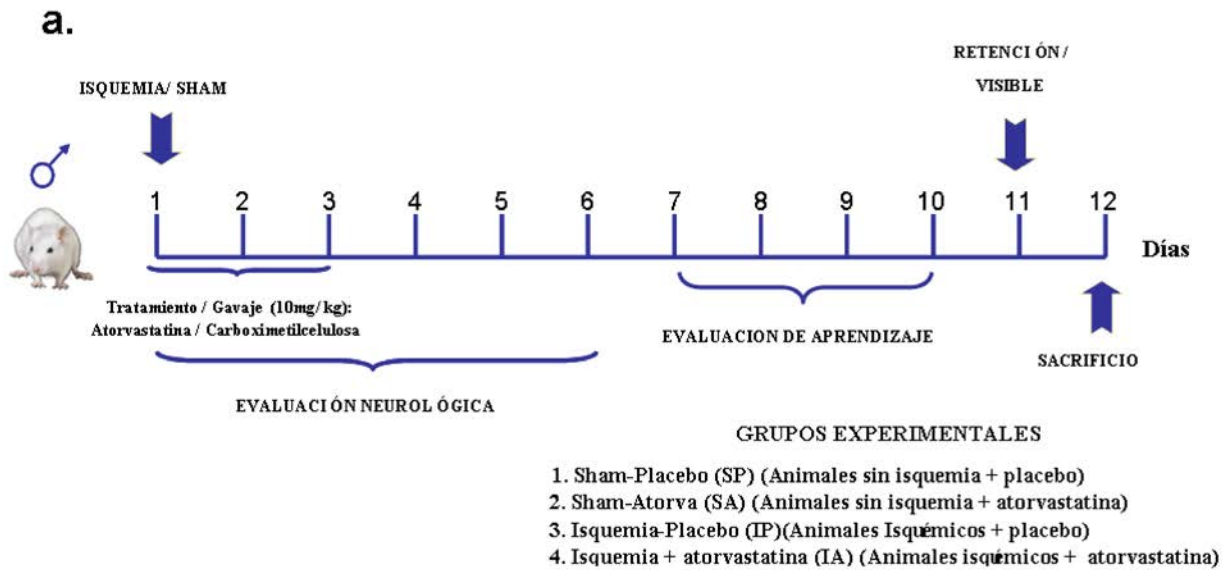
- Visible: La tercera fase evalúa el reconocimiento visual de la plataforma, estando fuera del agua y revestida de blanco, así como la capacidad motora al medir el tiempo de llegada del animal a ésta.

Una vez terminada la evaluación de aprendizaje y memoria espacial todos los animales se sacrificaron para el análisis celular y bioquímico correspondiente.

8. 5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

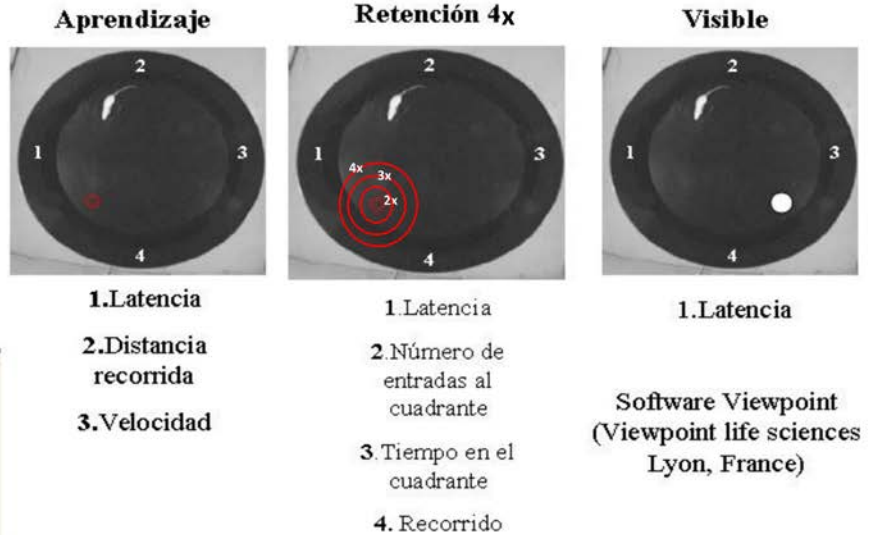
Un total de 16 animales (n=4) (Ver tabla 3) fueron sometidos a anestesia general (Xilacina 10mg/kg + Ketamina 90 mg/kg vía intraperitoneal) e inmediatamente perfundidos vía intracardiaca con una bomba peristáltica (Varistaltic pump plus-manostat Barnaut Company), utilizando 300 ml de solución salina al 0,9% y 300 ml de paraformaldehido al 4% (0.1 M buffer fosfato salino, pH 7.4) por cada animal. Los cerebros fueron removidos y post-fijados con paraformaldehido al 4% a 4°C durante 48 horas, luego preservados llevando a cabo un gradiente creciente de sucrosa (7%, 25%, 30%) a 4°C y después de esto, se colocaron en una solución criopreservante a -20°C. Se realizaron cortes coronales de 50 micrómetros en un Vibrátomo Leica VT1000S (Leica Microsystems).

Figura 7. Cronograma y protocolo general para la evaluación del laberinto acuático de Morris.



b.

Laberinto Acuático de Morris



a) Esquema cronológico que ilustra los tiempos del tratamiento con atorvastatina, la evaluación neurológica, la evaluación de aprendizaje y memoria espacial y posterior sacrificio luego de la inducción de la isquemia cerebral. b) Pasos cruciales para el desarrollo del laberinto acuático de Morris (Aprendizaje, retención y visible).

Tabla 3: Número de animales seleccionado para la realización de las diferentes pruebas celulares y moleculares.

Procedimiento	Sham- Placebo	Sham- Atorva	Isquemia- placebo	Isquemia- Atorva	Total animales
Análisis celular: Nissl, Fluor Jade, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	4	4	4	4	16
Análisis bioquímico: IP, ELISA, Western Blot.	6	6	6	6	24
40					

8. 5. 1. Tinción histológica

Para evaluar la población neuronal, cortes seriados antero-posteriormente por cada animal fueron montados en láminas portaobjetos y teñidos mediante Nissl (Azul de Toluidina, Sigma). Para esto, los cortes fueron hidratados en agua durante 1 minuto y luego llevados al colorante durante 17 minutos. Posteriormente el exceso de colorante fue eliminado a partir de un lavado activo en agua durante 1 minuto, y los tejidos fueron sometidos a una deshidratación creciente en alcoholes del 70% (2 minutos), 96% (2 minutos) y 100% (4 minutos). Por último, las láminas se sumergieron en xileno durante 10 minutos y se sellaron con Consult-Mount® (Thermo Shandon). Los tejidos fueron observados y analizados a través de un microscopio de luz (Nikon eclipse E200), y las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital Nikon (Sight DS-L1).

Para determinar las zonas en degeneración producto de la isquemia cerebral, se realizó la tinción de fluoro-jade (Schmued et al., 2000), el cual es un fluorescente polianiónico

que tiñe específicamente neuronas en degeneración por su aumento en la acidez metabólica, dando células Fluoro-Jade positivo detectado bajo fluorescencia verde brillante en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX 81).

8. 5. 2. Inmunohistoquímica

Inicialmente los cortes cerebrales de los grupos experimentales se trataron con metanol y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer fosfato salino (PBS) 0.1 M (pH 7.4) para evitar actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente se llevaron a cabo tres lavados con Tritón X-100 0.3% (v/v) en PBS 0.1 M para aumentar la permeabilidad de los tejidos y se incubaron 30 minutos con 0,5% (v/v) Tritón X-100 en PBS 0.1 M. Luego se volvieron a lavar con Tritón X-100 0.3% (v/v) en PBS 0.1 M. otras tres veces. Los sitios inespecíficos se bloquearon mediante preincubación con BSA (1%) y Tritón X-100 0.3% (v/v) en PBS 0.1 M durante 1 hora. Los cortes se incubaron 24 horas con los anticuerpos primarios (NeuN 1:500; MAP2 1:1000) diluidos en solución de incubación (PBS 0.1 M con 0.3% (v/v) de Tritón X-100 y BSA al 0.3%) a 4°C. Luego se lavaron 5 veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios (mouse biotina 1:250; rabbit biotina 1:250) durante 1 hora a temperatura ambiente y posterior a esto se incubaron 1 hora con un complejo Avidina-Biotina (PIERCE®; 1:250 del reactivo A y B), se lavaron nuevamente y se revelaron con una reacción cromogénica DBA (Diaminobencidina) en peróxido de hidrógeno 0,01%. En el procedimiento se realizó un control negativo para cada grupo experimental y para cada anticuerpo primario utilizado, siguiendo el mismo protocolo pero sin la incubación con el anticuerpo primario respectivo.

Los cortes fueron montados en láminas portaobjetos, dejando secar durante 24 horas a RT, y se les realizó una deshidratación creciente con agua, alcoholes (70%,96%,100%) y xileno. Finalmente las placas fueron selladas con Consult-Mount® (Thermo Shandon), analizadas a través del microscopio de luz (Nikon eclipse E200), y las imágenes se capturaron utilizando la cámara digital Nikon (Sight DS-L1).

La cuantificación de la intensidad de la inmunoreactividad por área seleccionada (Corteza motora primaria, corteza motora secundaria, estriado, CA1, CA2, CA3 y Giro

dentado de hipocampo) fue determinada en un área total de 1228800 mm², área total de la imagen en 40x y analizada mediante el programa Image J (NIH software) en la imagen pasada a un sistema binario (imagen a blanco y negro) a través de las opciones: **1.** Image/Adjust/Brightness-contrast. **2.** Process/Binary/Make binary. **3.** Analyze/Analyze particles.

8. 5. 3. Inmunofluorescencia y análisis de clusters

Los cortes de cerebro en bregmas específicos donde fue observada la lesión fueron inicialmente calentados (80°C) en Tris 10mM pH 6 para incrementar la exposición del antígeno, y luego tratados con cloruro de amonio (NH₄Cl) durante 20 minutos para evitar la autofluorescencia. Se realizaron tres lavados con Tritón X-100 (0.3% v/v) en PBS 0.1 M. Para aumentar la permeabilidad de los tejidos, estos se incubaron 30 minutos con Tritón X-100 (0,5% v/v) en PBS 0.1 M. Los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo fueron bloqueados usando BSA (3%) y Tritón X-100 (0.3% v/v) en PBS durante 60 minutos. Los cortes fueron luego incubados toda la noche a 4°C con los respectivos anticuerpos primarios anti-NR2B (policlonal rabbit 1:250), anti-PSD95 (monoclonal mouse 1:500, Calbiochem). Después de tres lavados con Tritón X-100 (0.3% v/v) en PBS, los tejidos fueron incubados con anticuerpos secundarios: rabbit alexa fluor 594, y mouse alexa fluor 488 (Molecular probes, 1:1000) 90 minutos a RT y Hoechst (Sigma 1:1000) adicionado durante los últimos 15 minutos de incubación. Para finalizar, se realizaron lavados con PBS y los tejidos se montaron en láminas portaobjetos usando Gel Mount™ (Biomed) en condiciones de oscuridad. En el procedimiento se realizó un control negativo para cada grupo experimental y para cada anticuerpo primario utilizado, siguiendo el mismo protocolo pero sin la incubación con el anticuerpo primario respectivo y el hoechst. Los tejidos fueron observados en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX 81, y el análisis de las imágenes fue llevado a cabo usando el software Image Scope Pro AMS 6.1 (Media Cybernetics).

Para el análisis por fluorescencia de NR2B y PSD-95, las imágenes se analizaron con el programa Image J (Image J – National Institute of Health). Para esto, inicialmente se

tomaron las imágenes originales y se contrastaron de tal forma que en la imagen únicamente aparecieran los clusters (Puntos más brillantes). Luego se pasó a un sistema binario (Blanco y negro). Esto se realizó en 15 células por animal para la región de la corteza motora, primaria donde se analizó, el tamaño de cada cluster de cada célula y el número de estos cluster por célula.

8. 6. ANALISIS BIOQUÍMICO

Un total de 24 animales (n=6) (ver tabla 3) fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia general (Xilacina 10mg/kg; Ketamina 90 mg/kg), y sus cerebros fueron removidos rápidamente. La corteza cerebral y el hipocampo fueron aislados y homogenizados en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, Glicerol 10%, NP40 1%). Las muestras permanecieron siempre en un ambiente frío para evitar la degradación de las proteínas. Los lisados fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 3 minutos a 4°C, y las proteínas presentes en el sobrenadante fueron cuantificadas por el método de Bradford (Fred M. et al., 2003). Posteriormente, los lisados fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

8. 6. 1. Inmunoprecipitación de proteínas

Se tomaron entre 250-300 ug de cada uno de los lisados y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante con el anticuerpo primario (anti-NR2B) en una relación 1:250. Posteriormente, se adiciono a cada lisado 30uL de perlas de Proteína A Sefarosa (Sigma-Aldrich) (la selección del tipo de sefarosa se determinó de acuerdo al isótopo del anticuerpo utilizado) incubando durante 2 horas a RT. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con tampón de lisis (500 uL) sin cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasas, retirando el sobrenadante cada vez. Se reconstituyo el pellet con tampón de carga 5X. Finalmente, las muestras fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos, centrifugadas a 13000 rpm y analizadas mediante electroforesis en

geles de poliacrilamida – dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con una resolución del 8%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y éstas fueron incubadas con los anticuerpos anti-PSD95 (monoclonal mouse 1:1000 Calbiochem), anti-NR2B (policlonal rabbit 1:1000). El lisado total fue usado como control negativo de precipitación y también se incluyó el control de especificidad del IgG. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TTBS e incubadas con el anticuerpo secundario (anti – IgG mouse o anti – IgG rabbit 1:10000) acoplados a peroxidasa durante 1 hora a RT. La señal inmunorreactiva fue desarrollada con el sistema de quimioluminiscencia (PIERCE®) seguida por la exposición de las membranas a películas autorradiográficas (Fuji-film). El análisis densitométrico de las bandas obtenidas fue realizado con el software Quantity one (The Discovery Series™ Quantity One® 1-D Analysis Software-Bio-Rad). Los resultados de cada membrana fueron normalizados con respecto a los valores de la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG).

8. 6. 2. Western blotting

Para el análisis por western blotting, se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida–dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia electroforética (mini Trans – blot Electroforetic Transfer Cell, BioRad, Hercules, CA, USA) a 300 miliamperios durante 2 horas. Las membranas se bloquearon y a continuación se incubaron 24 horas a 4°C con los anticuerpos primarios (NR2B 1:100; PSD95 1:100). Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti – IgG mouse o anti – IgG rabbit 1:10000) acoplados a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. La señal inmunorreactiva se reveló con un sistema de quimioluminiscencia (PIERCE®) seguida por la exposición de las membranas a películas autorradiográficas (Amersham®). El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó con el software Quantity one (The Discovery Series™ Quantity One® 1-D Analysis Software-Bio-Rad).

8. 6. 3. ELISA

El inmunoensayo por ELISA se realizó para cuantificar los niveles de BDNF en los cuatro diferentes tratamientos SP, SA, IP e IA utilizando un kit comercial (BDNF Emax ImmunoAssay System; Promega Corp., Madison, WI) y siguiendo las especificaciones detalladas en este. Para esto, se tomó un plato multi-pozo de 96 pozos, se inmunizó con el anticuerpo para BDNF (1:1000) y se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con TTBS (buffer fosfato+Tween 1%). Luego se trató con una solución de y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

Después de la incubación, se lavó 3 veces con TTBS, se colocaron los lisados () de las proteínas junto con los estándares y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Seguido a esto, se lavó 5 veces con TTBS, se adicionó anti human-BDNF pAb (1:500) en los pozos, se incubó 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Luego se lavó otras 5 veces con TTBS, se adicionó IgY HRP y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (500rpm). Transcurrida la hora, se lavó con TTBS otras cinco veces, se adicionó a cada pozo de TMB one solution para revelar la reacción y se incubó 10 minutos. La reacción se detuvo adicionando HCL (1N) en el mismo orden que se adicionó el TMB y se incubó por 30 minutos. Las muestras se llevaron a un lector con absorbancia de 480nm.

8. 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de significancia de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS Statistics versión 19.0.

Para el análisis del laberinto acuático de Morris se tomó un n=9. Este número inicial (n=9) se dividió en un n=4 y n=5 para el análisis histológico y bioquímico respectivamente.; n es el número de animales por grupo.

La prueba de homogeneidad de varianzas se aplicó dentro de todo el estudio para determinar cuáles datos seguían una distribución normal

Datos obtenidos a partir del laberinto acuático de Morris: se realizó una ANOVA de medias repetidas, análisis de homogeneidad de varianzas y análisis post hoc de Tukey para los datos de latencia, distancia y velocidad en la prueba de aprendizaje y visible. Para la prueba de retención se realizó una ANOVA de un factor así como prueba de homogeneidad de varianzas y análisis post hoc de Tukey.

Para los datos obtenidos por inmunohistoquímica, Inmunoprecipitación y ELISA se realizó Un ANOVA de un factor, así como un análisis de homogeneidad de varianzas y análisis post hock de Tukey.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó una significancia estadística $p=0.05$.

9. RESULTADOS

9. 1. Evaluación neurológica

La evaluación neurológica de todos los animales se realizó a partir de las 6 horas post-isquemia. Esta evaluación estuvo fundamentada en el protocolo de Yrjanheikki que mantiene una puntuación que va de 0 (Donde no hay ningún tipo de movimiento espontaneo) a 6 (donde hay movimientos espontáneos naturales) (ver tabla 2) (Yrjanheikki, J. et al.,2005).

Los resultados de la evaluación neurológica hechos hasta el día 6 post-isquemia, muestran que los animales controles SP y SA mantuvieron siempre un puntaje neurológico de 6 mientras que los animales IP poseen un puntaje promedio de 3 a las 24 horas post-isquemia, llegando a un puntaje promedio de 6 a las 72 horas post-isquemia aproximadamente. Este puntaje es mejorado tras el tratamiento con atorvastatina donde se observa que los animales IA tienden a mejorar más rápido a partir de las 24 horas post-isquemia con un puntaje de 4, para una recuperación prácticamente completa a las 48 horas con un puntaje promedio de 6 (Figura 9).

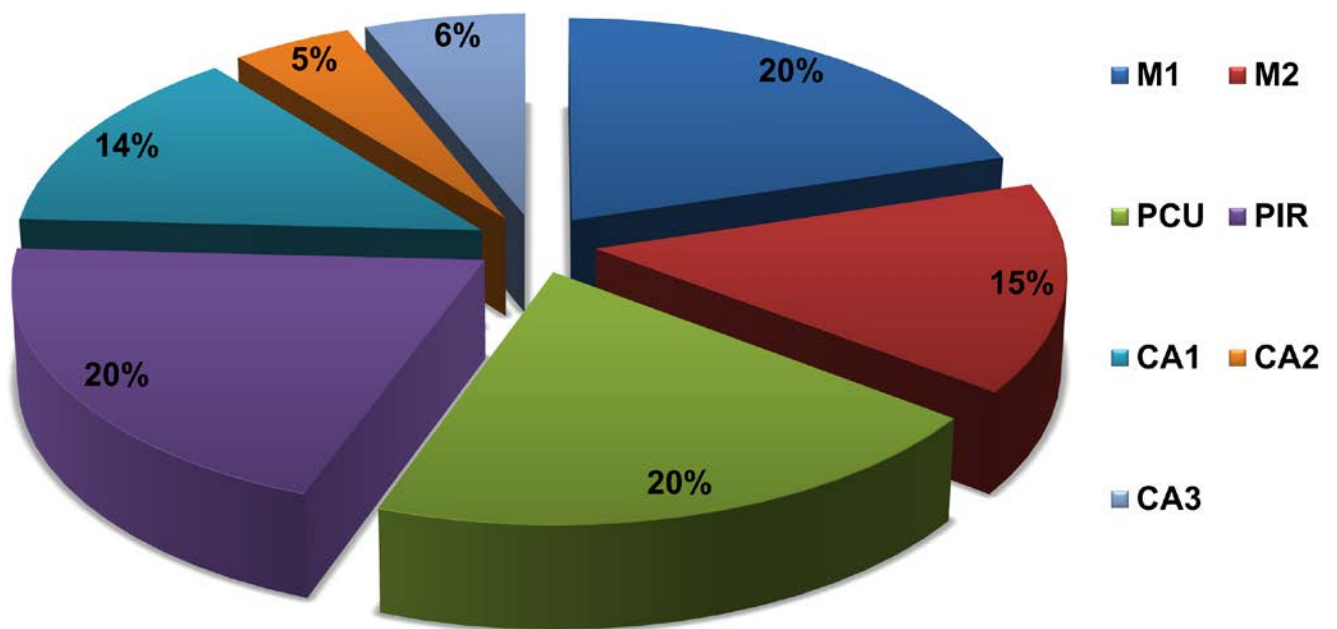
9. 2. Distribución del daño neuronal

El daño neuronal provocado por la oclusión transitoria de la arteria cerebral media produjo lesión en diferentes zonas cerebrales evaluadas a lo largo del eje antero-posterior del cerebro de rata. Se encontraron 8 áreas infartadas a partir del análisis realizado por la tinción de Nissl, fluorojade, NeuN (marcaje de núcleos neuronales) y MAP-2 (Marcaje de dendritas) en los cuatro animales ischemia placebo. Este daño contempla cambios a nivel morfológico, acidosis metabólica y perdida de inmunorreactividad de marcadores estructurales.

Del daño total generado por la t-MCAO, hay un 20% de daño (en igual magnitud) para la corteza motora primaria, para el putamen caudado y para la corteza piriforme. Este

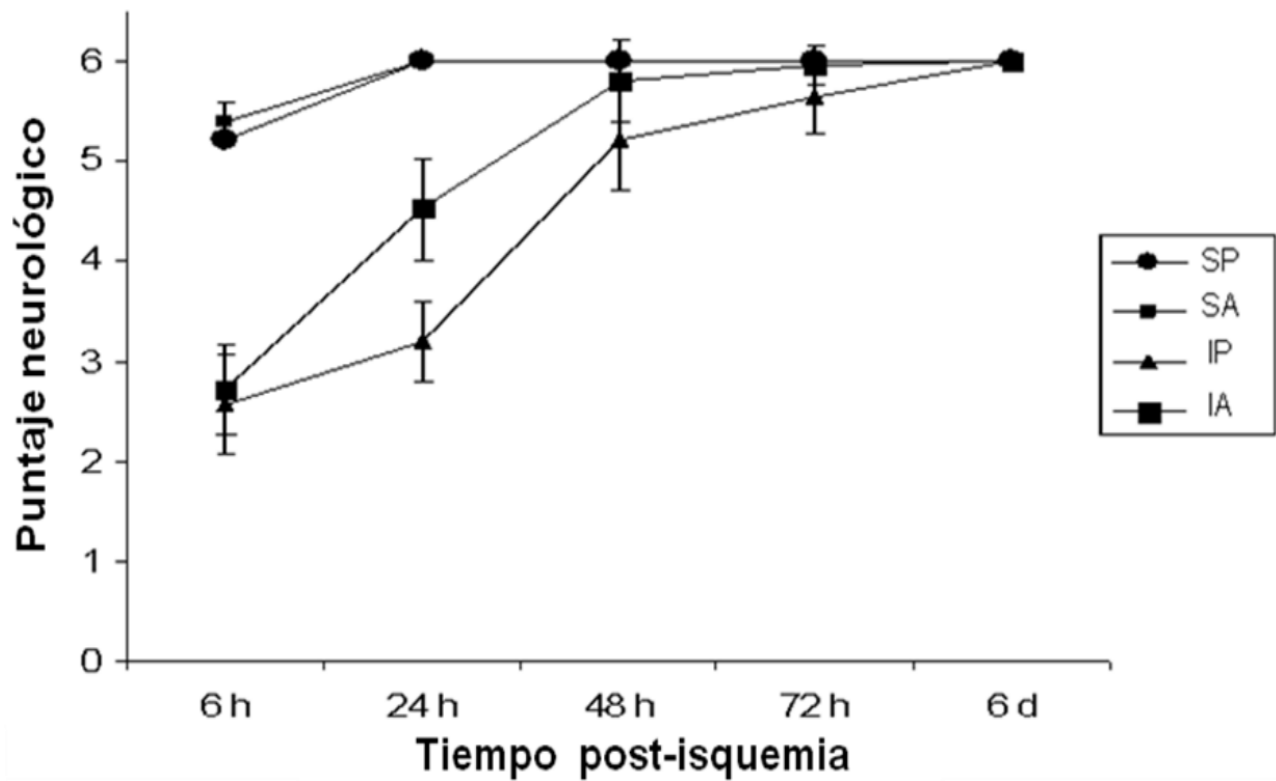
daño es seguido en la corteza motora secundaria (15%), las regiones CA1 (14%), CA3 (6%), CA2 (5%) y el giro dentado (0%) del hipocampo respectivamente (Figura 5). Estos porcentajes de daño provienen de dos bregmas principales que fueron los que más mostraron evidencia del daño neuronal luego de la inducción de la isquemia cerebral focal: Bregma (-1.30) (Sección anterior del cerebro) y el bregma (-3.60) (Región medial-posterior del cerebro) (Figura 8).

Figura 8. Porcentaje de distribución total del daño neuronal provocado por la isquemia cerebral focal.



M1: corteza motora primaria; M2: corteza motora secundaria; PCU: putamen caudado; PIR: corteza piriforme; GD: giro dentado, CA1, CA2, CA3: regiones hipocampales.

Figura 9. Evaluación neurológica realizada a partir de las 6 horas post-isquemia.



SP: Sham-Placebo; SA: Sham-Atorvastatina; IP: Isquemia-Placebo; IA: Isquemia-Atorvastatina

9. 2. 1. Corteza cerebral:

En la región del bregma -1.30, la t-MCAO genera una alteración morfológica evidente en la corteza motora primaria a través de la tinción de Nissl para animales IP (Figura 10), se observan cuerpos celulares condensados con un marcaje azul oscuro más intenso y con una forma de tipo “triangular”, características morfológicas que no son evidenciadas en los grupos SP y SA (Figura 10 A. a). También se observa a través de MAP-2, el cual es un marcador de proteínas asociadas a microtúbulos que comúnmente marca dendritas, un daño muy significativo en estos animales IP, ya que su inmunorreactividad se fragmenta a lo largo de las proyecciones neuronales (Figura 10 A b) y se pierde la intensidad de la inmunorreactividad ($p < 0.000$) en comparación con los grupos SP y SA (Figura 10 A. b; 10 B. a). Así mismo, para NeuN, marcador núcleos neuronales, se observa una tendencia hacia una disminución del marcaje en animales IP (Figura 10 A. c; 10 B. b). El marcaje con fluorojade dio negativo para esta zona cerebral a 12 días post-isquemia para todos los tratamientos IP (Figura 10 A. d)

También se encontró lesión en la corteza motora secundaria, donde en animales IP se observa el mismo daño morfológico, (Figura 11 A. a), El daño estructural también es evidenciado por el marcaje de MAP-2 ($p < 0.000$) a lo largo de las proyecciones neuronales (Figura 11 A. b; 11 B. a). Además, la pérdida del marcaje de NeuN también es significativa ($p = 0.04$) en estos animales (Figura 11 A. c; 11 B. b). El marcaje con fluorojade dio negativo en todos los tratamientos, inclusive en los animales IP (Figura 11 A. d).

En la corteza piriforme también se ve un daño morfológico con cuerpos celulares condensados marcados más intensamente y esta vez de forma alargada para animales IP (Figura 12 A. a). El daño estructural se observa en el marcaje de MAP-2 donde se observa el mismo patrón de inmunorreactividad fragmentada ($p = 0.02$) (Figura 12 B. a) a lo largo de las proyecciones neuronales (Figura 12 A. b). La pérdida del marcaje de NeuN es significativa ($p = 0.018$) (Figura 12 A. c; 12 B. b). El marcaje con fluorojade dio

positivo en estos animales, evidenciando la presencia de acidosis metabólica en esta parte del cerebro (Figura 12 A. d).

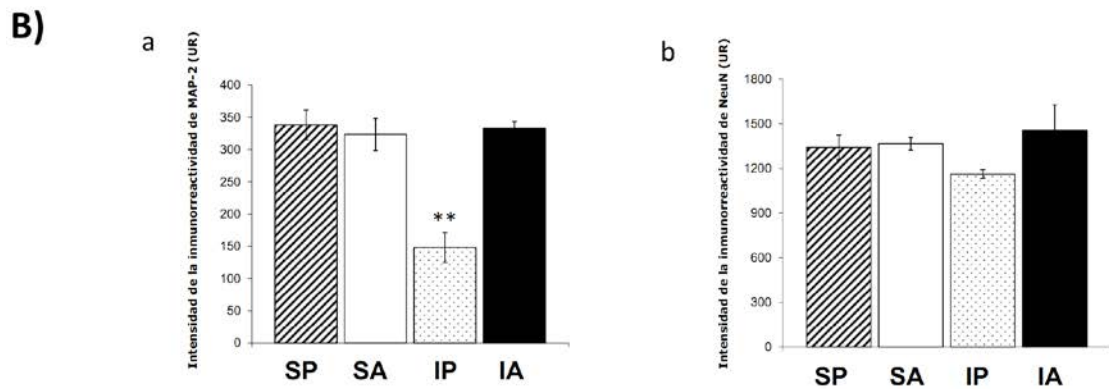
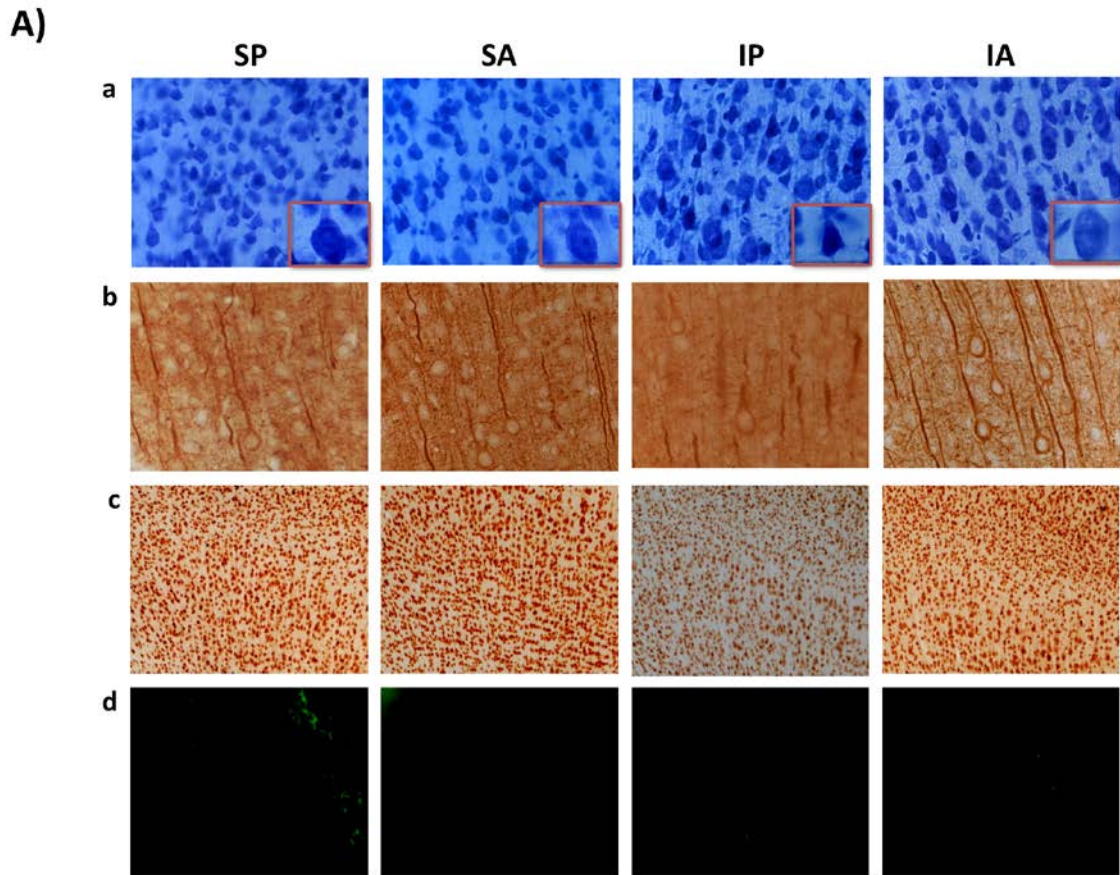
Por otro lado la atorvastatina revierte estos cambios morfológicos para estas tres zonas de la corteza cerebral (Corteza motora secundaria, corteza piriforme y putamen caudado) (evidenciados por Nissl NeuN y MAP-2) luego de la isquemia cerebral, ya que la morfología de las células en animales IA es similar a los grupos SP y SA, los cuales muestran un cuerpo celular redondo sin núcleos condensados y con un marcaje azul claro (Figura 10, 11 y 12). Además, el patrón de distribución de la inmunorreactividad para MAP-2 es revertido tras el tratamiento con atorvastatina restaurándose la intensidad de la inmunotinción (Figura 10, 11 y 12). En la corteza piriforme se observa que el tratamiento con atorvastatina promueve la protección del tejido disminuyendo la acidosis metabólica provocada por la t-MCAO (Figura 12).

9. 2. 2. Putamen caudado:

Para el putamen caudado se exhibe una morfología difusa y condensada del tejido en la tinción de Nissl para animales IP (Figura 13 A. a). En MAP-2 y NeuN el daño generó un exceso de fondo en el marcaje para ambas proteínas de forma significativa ($p=0.01$ y $p<0.000$ respectivamente) (Figura 13 A. b y c) comparado con los controles SP y SA. Además, se da la presencia de fluorojade positivo, lo que muestra que esta zona también ha generado una acidosis metabólica provocado por la isquemia cerebral (Figura 13 A. d).

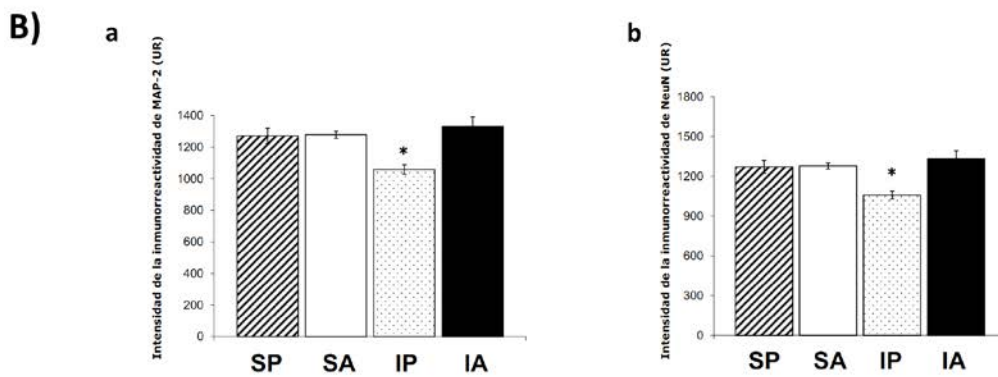
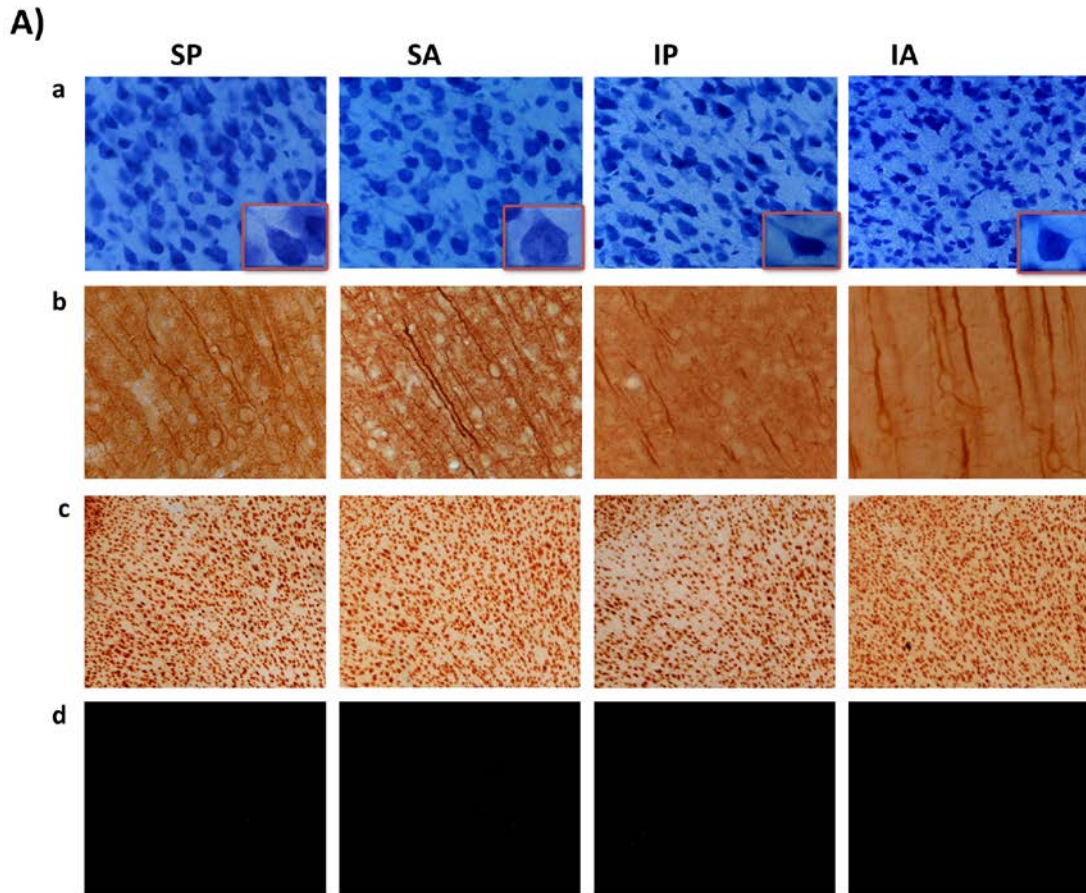
El tratamiento con atorvastatina promueve que la forma celular sea redonda, sin núcleos condensados y con un azul claro por toda la célula (Figura 13). Así mismo, la intensidad de la inmunorreactividad y la forma de la distribución de MAP-2 y NeuN son restauradas en animales IA (Figura 13). También, en los animales IA, el marcaje de fluorojade disminuye, mostrando que la acidosis metabólica disminuye tras el tratamiento con atorvastatina (Figura 13).

Figura 10. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la corteza motora primaria luego de una isquemia cerebral focal.



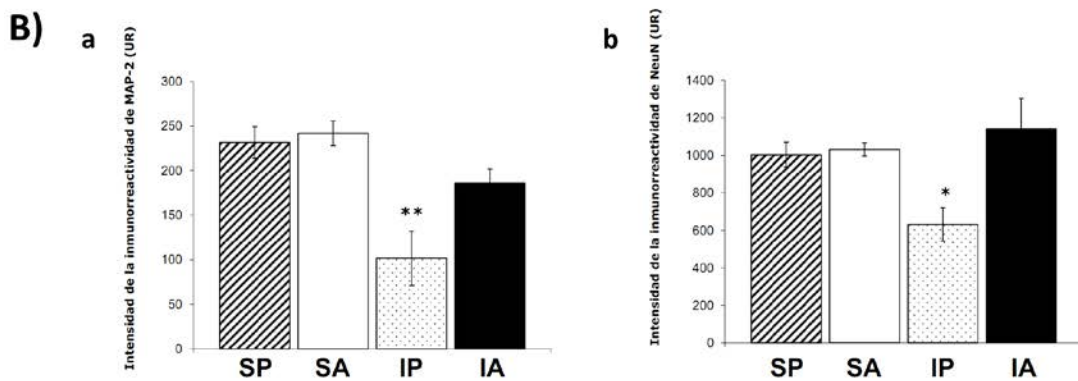
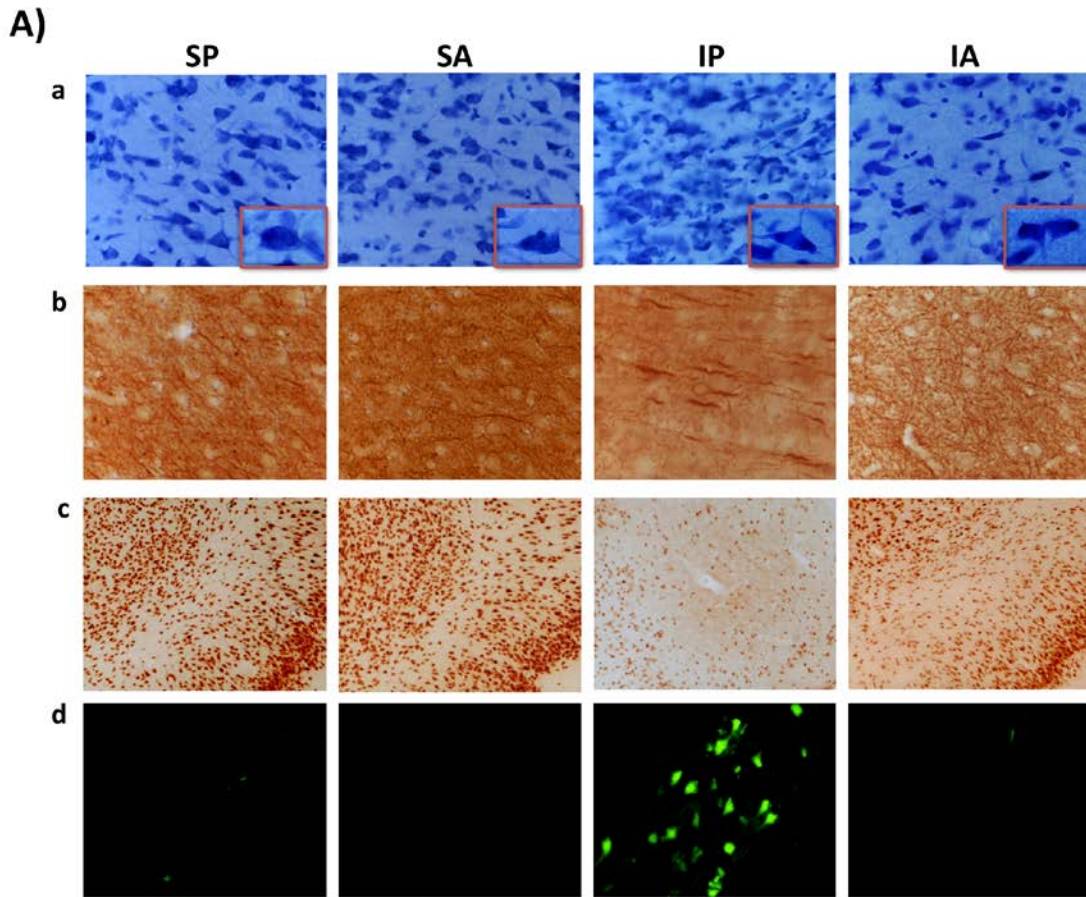
A) Imágenes representativas del brema (-1.30) para la tinción de a)Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorjade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

Figura 11. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la corteza motora secundaria luego de una isquemia cerebral focal.



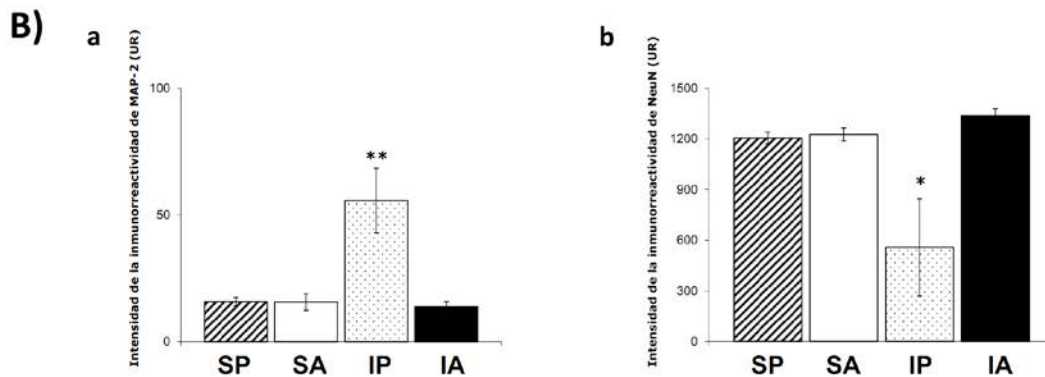
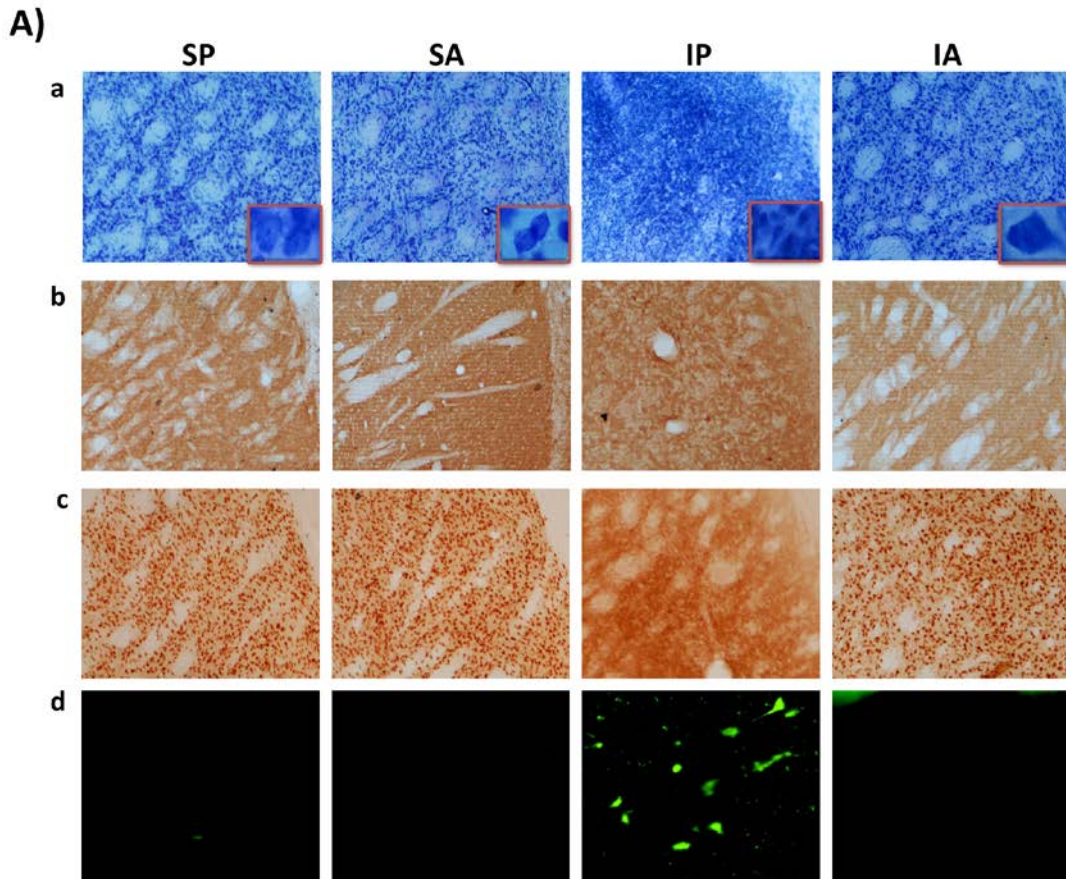
A) Imágenes representativas del brema (-1.30) para la tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.05 = *$).

Figura 12. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la corteza piriforme luego de una ischemia cerebral focal.



A) Imágenes representativas del brema (-1.30) para la tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmuno-reactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

Figura 13. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para el putamen caudado luego de una ischemia cerebral focal.



A) Imágenes representativas del brema (-1.30) para la tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorógeno para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

Todas las áreas evaluadas anteriormente en el bregma (-1.30) (corteza motora primaria, corteza motora secundaria, corteza piriforme y putamen caudado) mostraron los mismos efectos en la sección donde se evaluó el hipocampo (bregma -3.60). Osea que el daño se mantuvo a lo largo del eje anteroposterior para estas áreas evidenciando los mismos efectos morfológicos celulares para los animales IP. Así mismo el tratamiento con atorvastatina revierte esta morfología anormal (Ver anexos 1 al 7).

9. 2. 3. Hipocampo:

En el hipocampo (bregma -3.60) se analizaron sus diferentes regiones: CA1, CA2, CA3 y el Giro dentado.

En las regiones CA1, CA2 y CA3 no se observaron cambios aparentes dados por el efecto de la t-MCAO con la tinción de Nissl en los animales IP comparados con los controles SP y SA así como con los IA, viéndose estas regiones bien definidas y sin diferencias morfológicas (Figuras 14 A. a; 15 A. a; 16 A. a).

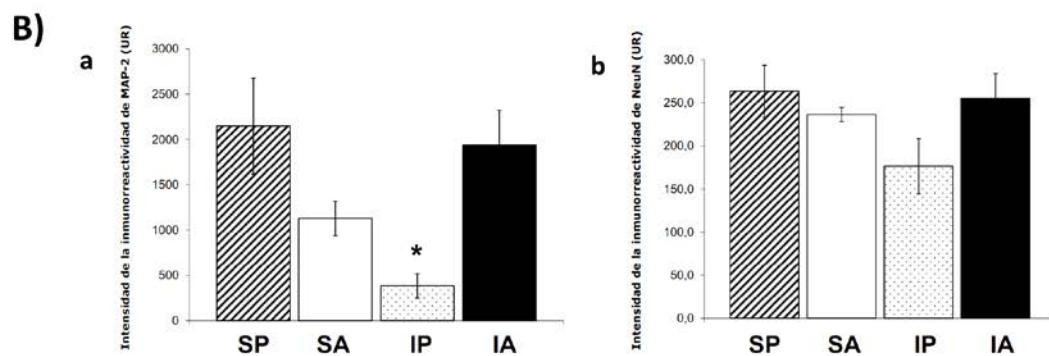
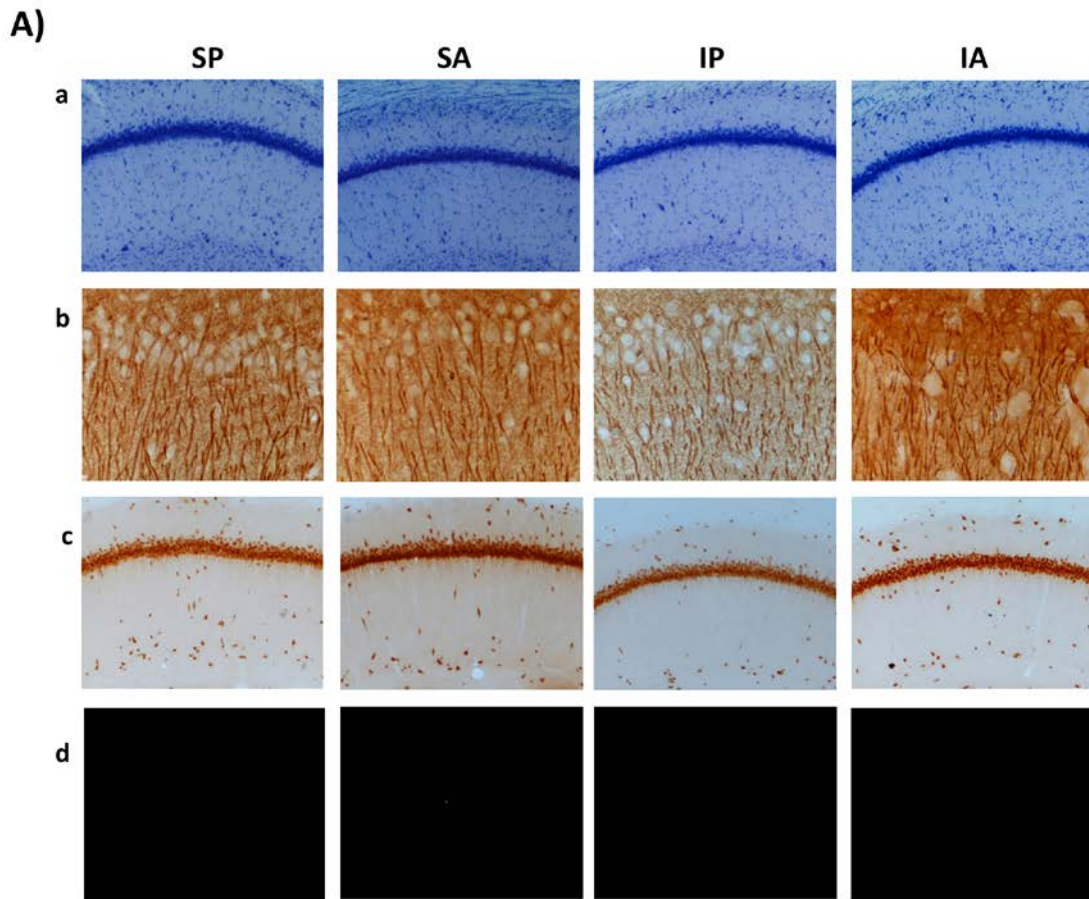
El efecto de la t-MCAO mostró con MAP-2 una fragmentación del marcaje para las regiones CA1, CA2 y CA3 a lo largo de todas las proyecciones de las células en animales IP (Figura 14 A. b; 15 A. b; 16 A. b), así como una disminución significativa en la inmunoreactividad contrastando con los controles SP y SA ($p=0.014$ para CA1; $p<0.000$ para CA2; $p<0.01$ para CA3). Para el marcaje de NeuN no se observó ninguna disminución en la inmunoreactividad en animales IP para la región CA2 (Figura 15 B. b). Aunque si una hay una tendencia a disminuir para las regiones CA1 y CA3 cuando se comparan con los controles SP y SA (Figura 14 A. c; 15 A. c; 16 A. c).

Sin embargo, se observa que el tratamiento con atorvastatina restaura esta fragmentación de la inmunoreactividad y promueve un marcaje continuo de MAP-2 a lo largo de todas las proyecciones neuronales (Figura 14 B. a; 15 B. a; 16 B. a). Así mismo, la tendencia a la disminución de la inmunoreactividad de NeuN es revertida tras

el tratamiento con atorvastatina, donde se observa una homogeneidad muy parecida a los controles SP y SA (Figura 14 B. b; 16 B. b).

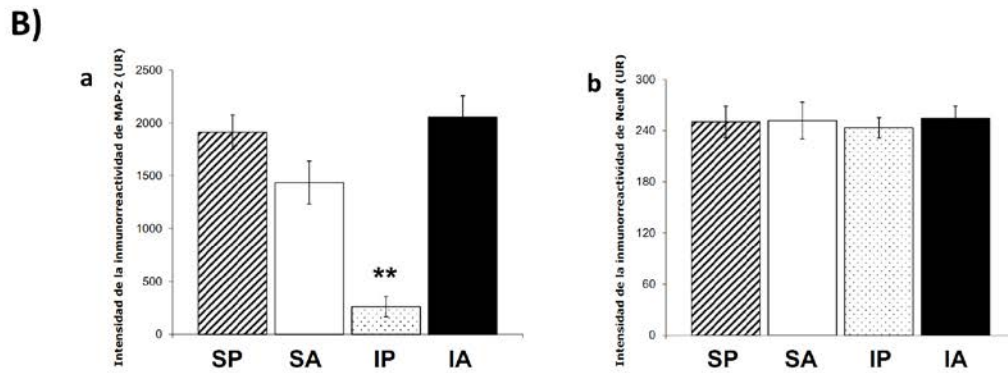
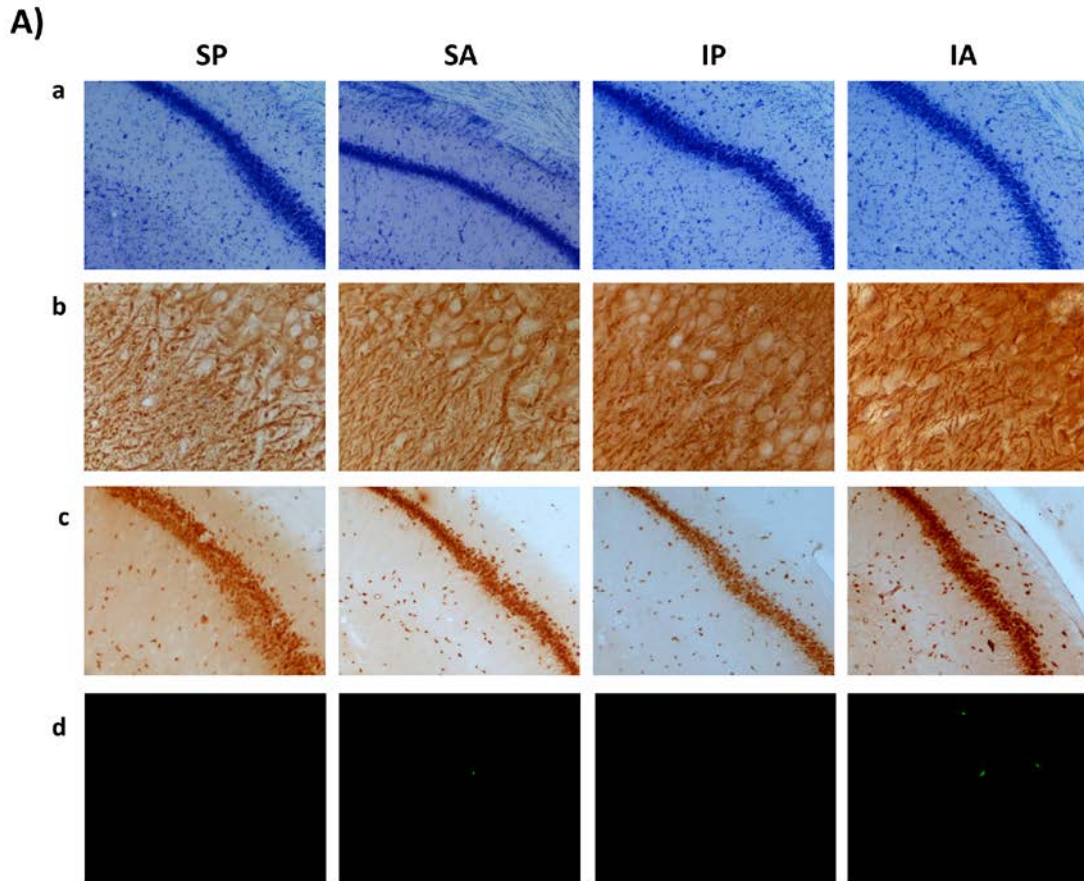
Para el giro dentado y sus tres diferentes regiones, la zona granular, la zona subgranular y el hillock no se observó ningún tipo de morfología que marcara algún tipo de patología neuronal debido a la isquémica cerebral focal. En las tres zonas se observaron células bien definidas, generando uniformemente cada una de estas tres capas del giro dentado. Así mismo, ninguna de estas regiones del giro dentado dio positivo para el marcaje de fluorocromo en ninguno de los tratamientos SP, SA, IP e IA (Anexos 5, 6, y 7).

Figura 14. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la región CA1 del hipocampo luego de una isquemia cerebral focal.



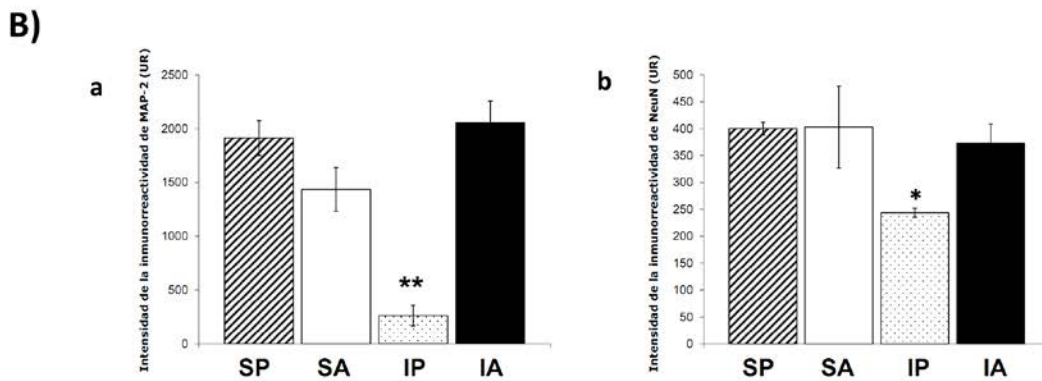
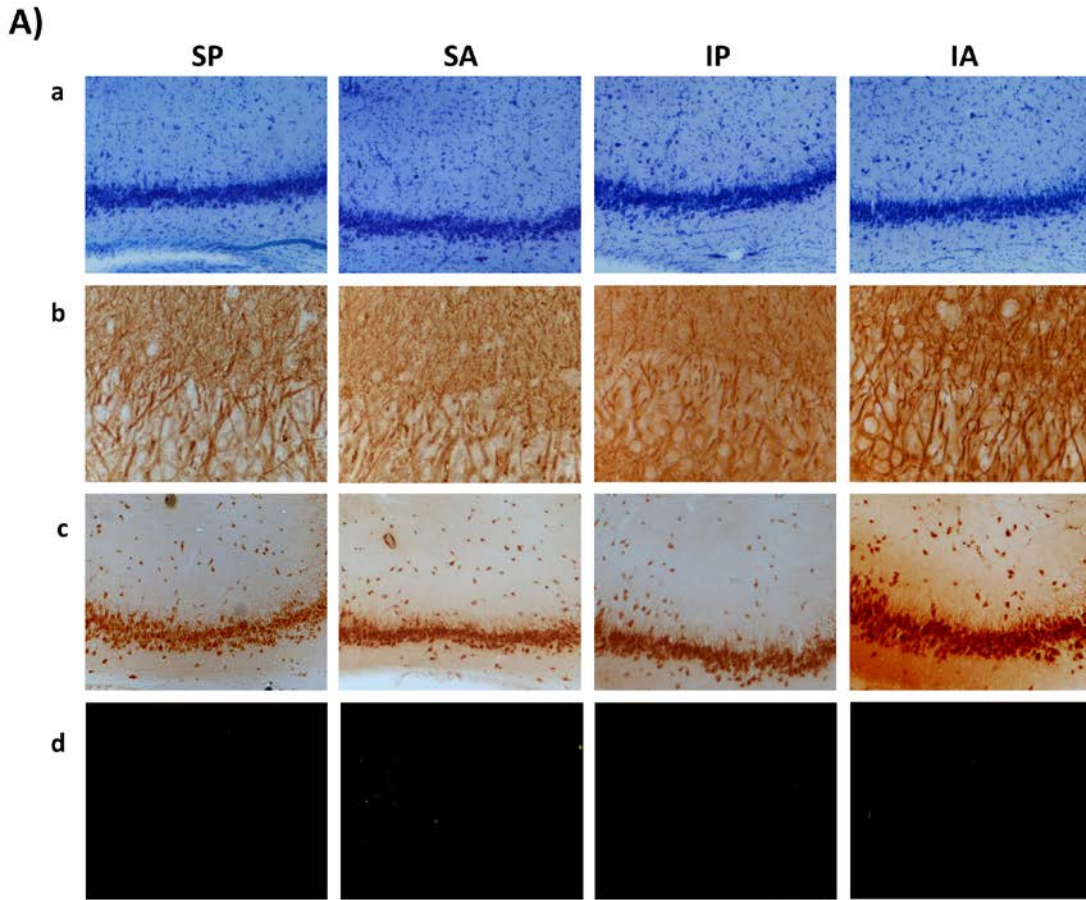
A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

Figura 15. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la región CA2 del hipocampo luego de una isquemia cerebral focal.



A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a)Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

Figura 16. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la región CA3 del hipocampo luego de una ischemia cerebral focal.



A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

9. 3. Expresión en corteza cerebral de los complejos NR2B/PSD-95 y BDNF.

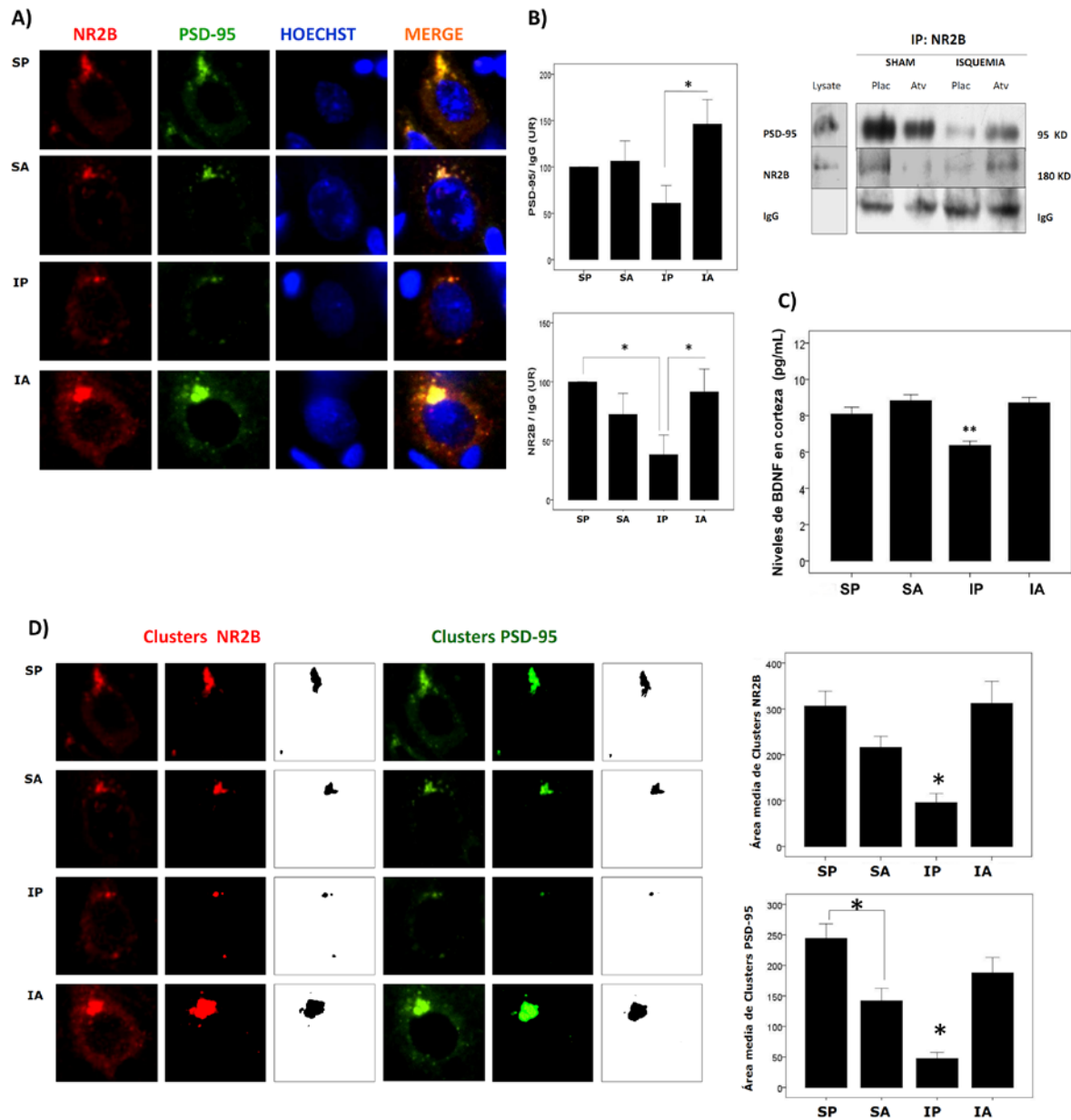
Los resultados de la Inmunofluorescencia (n=4) se realizaron en la corteza motora primaria en el bregma (-1.30). NR2B y PSD-95 se localizaron de una forma perinuclear en agregados o “clusters”, en la base de los procesos neuronales, lugar donde hay solapamiento estos dos marcadores (Figura 17 A).

Al realizar el análisis de los clusters para NR2B y PSD-95, pese a que no se encontró diferencia significativa en el número de cluster, si se evidencio que la relación del área total de los clusters con respecto al número total de estos (Área total/Número total) es reducida de forma significativa ($p < 0.000$) para los animales IP comparados con los controles SP, y SA. Esta reducción del área de cluster, tanto de NR2B como de PSD-95 causada por la t-MCAO es revertida tras el tratamiento con atorvastatina (Figura 17 D). Adicionalmente, se encontró que el área total de cluster en los SP es mayor que en los animales SA ($p < 0.000$) (Figura 17 D).

El análisis mediante inmunoprecipitación realizada para NR2B, respalda los resultados descritos anteriormente. Esta mostró una disminución significativa de esta subunidad del receptor NMDA en animales IP comparados con animales SP ($p = 0.04$) (Figura 17 B). Además, se muestra que la asociación de NR2B con PSD-95 disminuye de forma significativa ($p = 0.041$) (Figura 17 B). Por otro lado, la atorvastatina restablece los niveles de la subunidad NR2B ($p = 0.039$) y su asociación con PSD-95 de forma significativa ($p = 0.041$).

Los resultados obtenidos por ELISA para BDNF muestran que la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de este disminuye en la corteza cerebral de forma significativa ($p < 0.000$) en animales IP comparado con los SP y SA. Así mismo los niveles de BDNF en la corteza cerebral son restablecidos luego del tratamiento con atorvastatina (Figura 17 C).

Figura 17. Efecto de la atorvastatina a 12 días post-isquemia para NR2B/PSD-95 y BDNF.

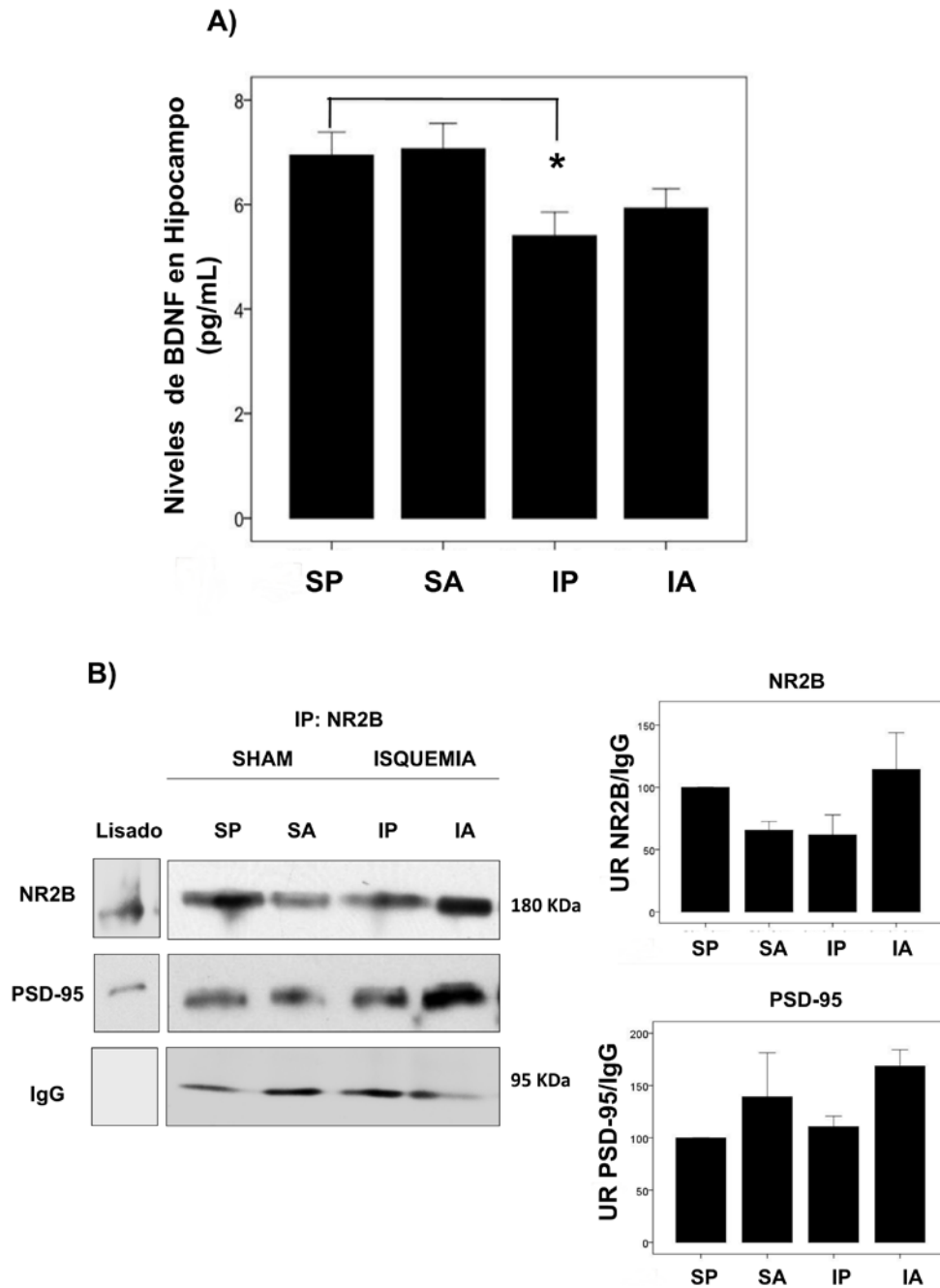


A) Inmunofluorescencia de los clusters de NR2B, PSD-95 a 12 días post-isquemia. B) La Inmunoprecipitación de NR2B (n=4) muestra una reducción significativa de los niveles de NR2B así como la asociación de NR2B con PSD-95 en animales IP comparados con los animales IA. C) Los niveles de BDNF en corteza disminuyen significativamente en animales IP respecto a los controles SP y SA. D) El área total comparada con el número total de clusters muestra una diferencia significativa para los animales IP en relación con los animales controles. El tratamiento con atorvastatina restaura la intensidad de la inmunorreactividad, los niveles de BDNF, NR2B así como su asociación con PSD-95 ($p < 0.05 = *$; $p < 0.05 = *$).

9. 4. Niveles de BDNF y los complejos NR2B/PSD-95 en hipocampo

Para el hipocampo se observa que hay una disminución significativa ($p=0.050$) de los niveles de BDNF en los animales IP comparados con los animales SP. Sin embargo, el tratamiento con atorvastatina no logra restaurar los niveles de BDNF cuando se compara con los controles SP y SA (Figura 18 A). También se observa en los resultados de la inmunoprecipitación de NR2B en el hipocampo, que los niveles de NR2B no disminuyen de forma significativa para los animales IP comparados con los SP y SA. En cuanto a la asociación de NR2B con PSD-95, se observa que esta asociación posee unos niveles variables para los controles SP y SA, así mismo estos no disminuyen de forma significativa para los animales IP, aunque el tratamiento con atorvastatina muestra una tendencia a aumentar los niveles de esta asociación (Figura 18 B).

Figura 18. Efecto de la atorvastatina a 12 días post-isquemia sobre los niveles de BDNF y la asociación de NR2B/PSD-95 en hipocampo.



A) Resultados por ELISA muestran una disminución significativa de BDNF ($\mu\text{g/mL}$) para los animales IP en hipocampo B) La inmunoprecipitación realizada para NR2B muestra que sus niveles así como su asociación con PSD-95 no disminuyen en animales IP en hipocampo. ($p < 0.05 = *$).

9. 5. Aprendizaje y memoria espacial mediante el laberinto acuático de Morris

Para la realización de la prueba de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris se tomó inicialmente un $n=10$. Sin embargo hubo cuatro animales (un animal para cada tratamiento SP, SA, IP e IA) que no se ajustaron a la media total para ninguno de los ensayos realizados (Aprendizaje, retención y visible) dentro de la prueba. Además, las pruebas histológicas realizadas para estos animales fueron una evidencia más que sustentó su exclusión del estudio (Ver anexo 8).

9. 5. 1. Prueba de aprendizaje

En la prueba de aprendizaje se tomó como referencia un tiempo de latencia promedio igual o por debajo de 20 segundos para todos los animales. Este tiempo fue descrito como el tiempo promedio de referencia para argumentar que los animales aprendieron. Este tiempo es independiente del número de ensayos realizados dentro de la prueba de aprendizaje, lo que habla de que se hacen tantos ensayos como sea posible hasta que los animales alcancen un tiempo de latencia promedio igual o por debajo de 20s. El número total de ensayos hasta alcanzar el tiempo de latencia promedio de 20s fue 8.

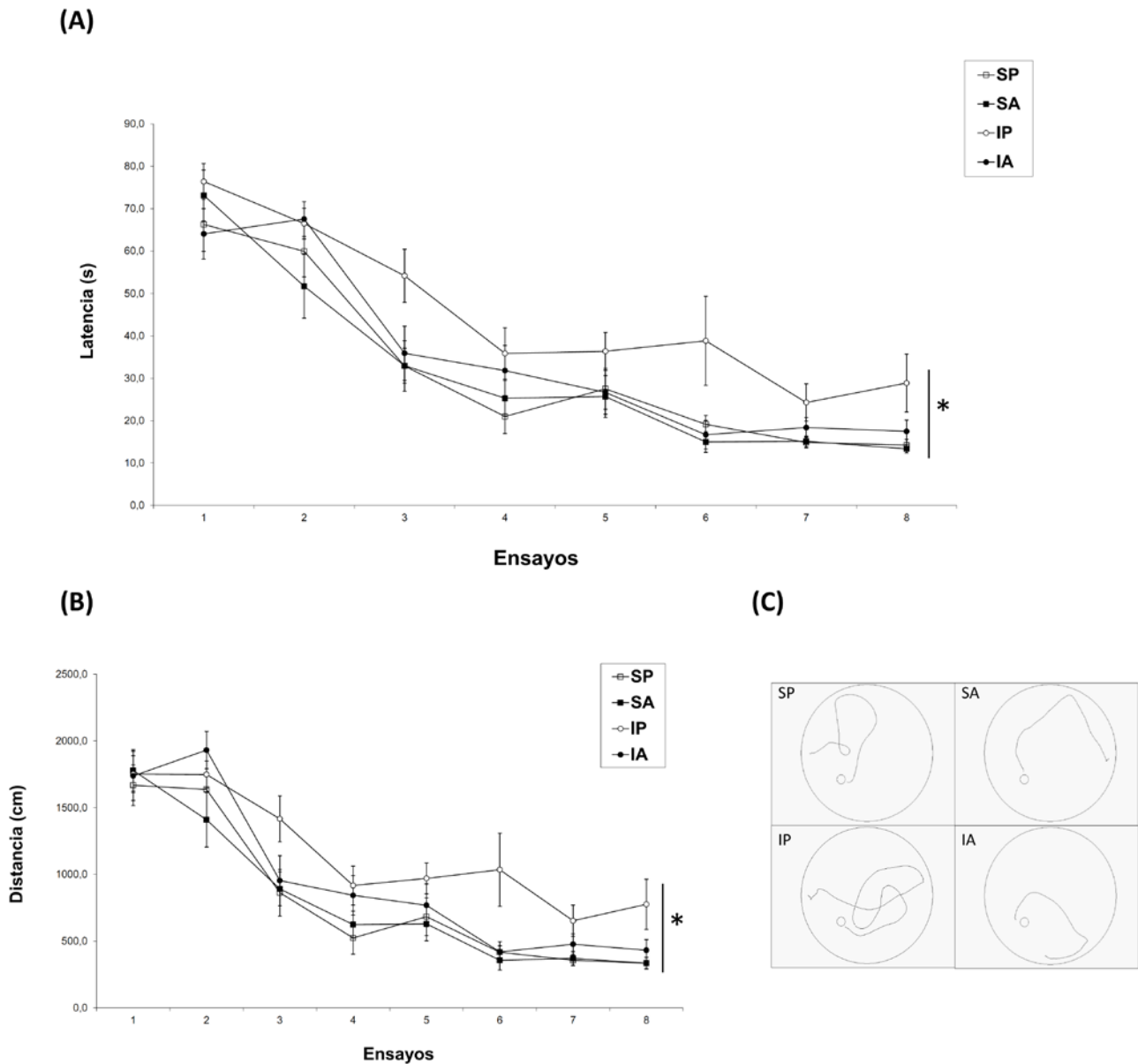
La prueba de aprendizaje muestra que hay una diferencia significativa ($p=0.007$) en los tiempos de latencia promedio para los animales IP, mostrando que estos animales demoran mucho más tiempo en aprender luego de una isquemia cerebral. Sin embargo, el tratamiento con atorvastatina disminuye los tiempos de latencia comparado con los animales controles SP y SA (Figura 19 A). La distancia recorrida también refleja de forma significativa ($p=0.005$) el daño generado por la t-MCAO, evidenciando que los animales IP recorren mucha más distancia para poder encontrar la plataforma dentro del laberinto acuático comparados con SP y SA. Este comportamiento es revertido por el tratamiento con atorvastatina, ya que los animales IA muestran una reducción de las distancias recorridas para alcanzar la plataforma y tienen tiempos similares a los obtenidos en animales controles SP y SA (Figura 19 B y C).

9. 5. 2. Prueba de memoria espacial

La prueba de retención o memoria espacial realizada un día después de la prueba de aprendizaje en el laberinto acuático mostró que los animales IP tienen un incremento significativo ($p=0.002$) en el tiempo de latencia requerido para cruzar por el lugar donde anteriormente estuvo la plataforma comparada con animales SP. Sin embargo, el tratamiento con atorvastatina reduce significativamente este tiempo de latencia mostrando tiempos muy similares a los controles SP y SA (Figura 20 A). En esta prueba las distancias recorridas en el área donde inicialmente estuvo la plataforma no son significativas en ninguna de las magnificaciones hechas para esta (Figura 20 B). Así mismo, el número de cruces por la plataforma no fue diferente para ninguno de los cuatro tratamientos SP, SA, IP e IA (Figura 20 C).

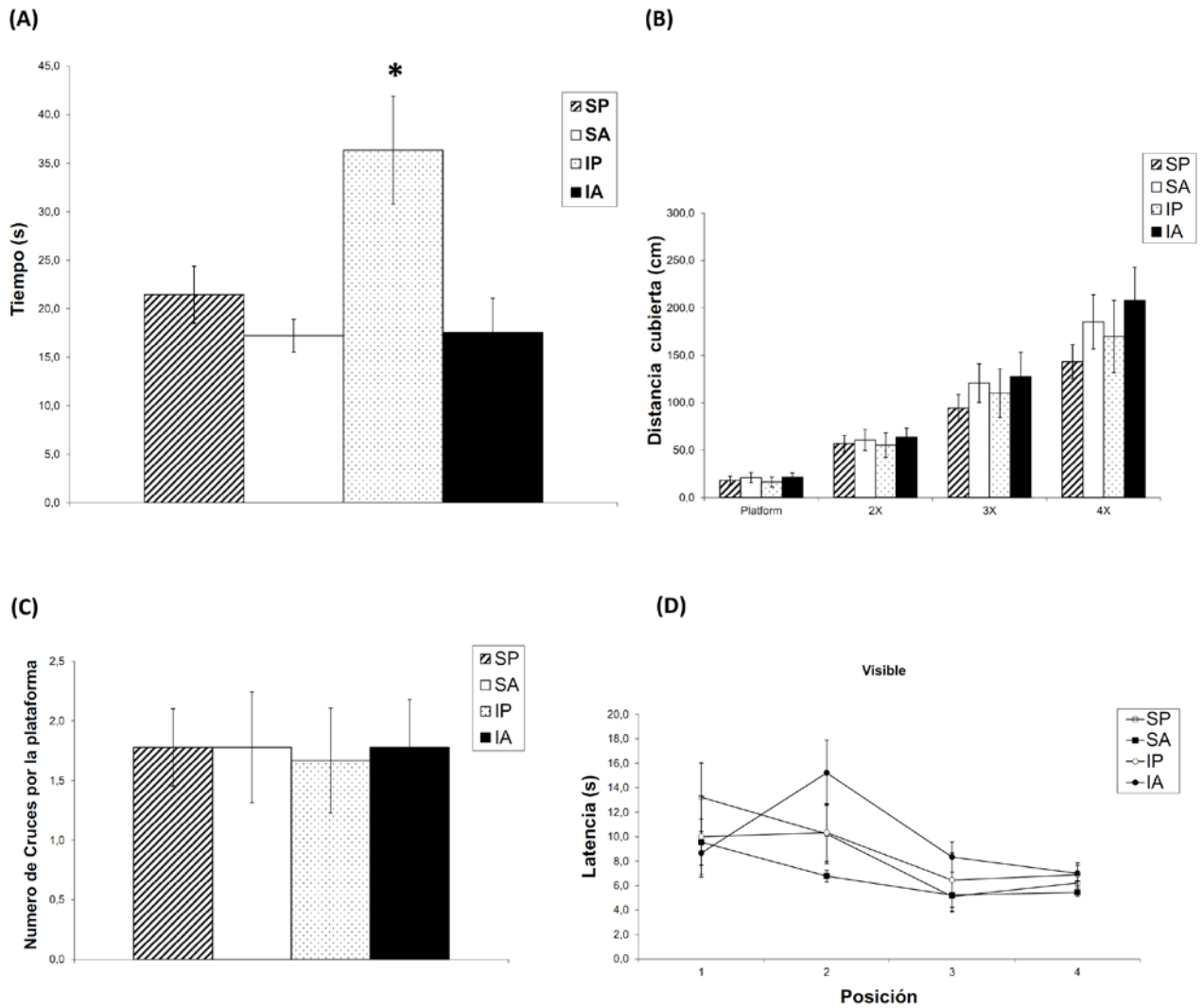
Con el fin de determinar que los animales no presentaban daños motores o visuales se realizó una prueba donde la plataforma estuvo visible. Para esto se tomaron 4 posiciones iniciales en los diferentes puntos cardinales, mostrando que no existe ninguna diferencia significativa en los tiempos de latencia para ninguno de los tratamientos SP, SA, IP e IA (Figura 20 D).

Figura 19. Restauración del aprendizaje espacial mediado por la atorvastatina a 12 días post-isquemia.



A) El tiempo de latencia promedio mostró una diferencia significativa para los animales IP comparado con los controles SP y SA así como con los IA. B) Los animales IP mostraron generar distancias promedio más grandes que los controles SP y SA, así mismo se observa que el tratamiento con atorvastatina disminuye los tiempos de latencias y las distancias recorridas. C) Grafico representativo de las distancias recorridas para los cuatro grupos SP, SA, IP e IA (n=9) $p < 0.05 = *$.

Figura 20. El daño en la memoria espacial es recuperado luego del tratamiento con atorvastatina en una isquemia cerebral focal.



A) La prueba de retención mostró un incremento significativo en el tiempo de latencia para los animales IP comparado con los controles SP y SA así como con los animales IA. La distancia recorrida (B) y el número de cruces por la plataforma (C) en la prueba de 4x no mostró ninguna diferencia significativa en ninguno de los tratamientos. D) La prueba visible no mostro daño alguno a nivel visual para ninguno de los animales (n=9) ($p < 0.05 = *$).

10. DISCUSION

10. 1. LA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL CAUSA ALTERACIONES LOCALIZADAS EN DIFERENTES ZONAS CEREBRALES

Los efectos que la isquemia cerebral causa en diferentes zonas cerebrales han sido muy caracterizados en diferentes modelos animales (Hossman, 2008). Particularmente, para la isquemia cerebral focal (t-MAO) se ha evidenciado un daño tisular en zonas como los ganglios basales en la zona de penumbra, la corteza somato-sensorial (Gutiérrez-Vargas et al., en preparación), la corteza piriforme (Jin et al., 2003) y la corteza suprasilviana (Hossman, 2008) e inclusive el putamen caudado (Zhang et al., 2010) y el hipocampo como zonas de penumbra (Zhang et al., 2010; Gutiérrez-Vargas et al., en preparación).

Nuestros resultados obtenidos tras la t-MCAO evidencian daños morfológicos y estructurales (a través de la tinción de Nissl, NeuN y MAP-2) en la corteza motora primaria, la corteza motora secundaria, la corteza piriforme y el putamen caudado (Figuras 10-13). Los daños evidenciados en la corteza cerebral y el putamen caudado pueden ser debido a la existencia de conexiones glutamatérgicas tanto aferentes como eferentes, que en condiciones fisiológicas normales median las transmisiones sinápticas rápidas para diferentes tipos de procesos como el movimiento, la percepción sensorial y espacial, entre otras (Dale Purves et al., 2008). Lo que sugiere que al generarse una concentración masiva de glutamato luego de un evento isquémico (para este caso la t-MAO), estas conexiones quedan predisuestas fisiológicamente a sufrir daños más marcados y severos, como lo observado en este estudio para la corteza cerebral y en el putamen caudado con la tinción de Nissl, MAP-2 y NeuN a 12 días post-isquemia.

Otro resultado que se muestra para el putamen caudado y para la corteza piriforme, es la presencia de acidosis metabólica generada tras la implementación del t-MCAO. Esto evidencia (junto con Nissl, MAP-2 y NeuN) que estas dos zonas fueron las más

afectadas a 12 días post-isquemia. Esto contrasta con resultados obtenidos en nuestro laboratorio donde a 72 horas post-isquemia no se observa ningún daño en la corteza piriforme pero si en el putamen caudado (Gutiérrez-Vargas et al., en preparación). Lo que puede ser debido a la conectividad de la red neuronal y a que en isquemia cerebral (implementando el t-MCAO) la evolución del infarto compromete diferentes zonas cerebrales conforme pasa el tiempo (Zhang et al., 2010).

En el hipocampo se encontró un cambio en el patrón de marcaje de MAP-2 para las regiones CA1, CA2 y CA3 mas no para Nissl (Figuras 14-16). Para NeuN solo se observó una disminución significativa de la inmunorreactividad en la región CA3 (Figura 16). Estos daños evidenciados por MAP-2 más no por Nissl pueden hablarnos acerca el papel fundamental que juegan las conexiones dendríticas en esta zona, ya que estos sitios neuronales son más sensibles a cualquier estímulo excitotóxico, mostrando un papel clave de los microtúbulos de las células neuronales. Así, en eventos de isquemia cerebral, a 12 días post-isquemia, puede no haber un daño y una pérdida significativa de las neuronas pero si de sus conexiones, generando una disfunción hipocámpal que conlleva a un déficit en procesos clave en el organismo como el aprendizaje y la memoria.

10. 2. LA ATORVASTATINA MEJORA EL DÉFICIT NEUROLÓGICO CAUSADO POR LA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Con el daño ocasionado por la t-MCAO, no solamente se generan lesiones a nivel tisular, sino también se dan eventos celulares y moleculares que conllevan a una desregulación homeostática del cerebro, manifestándose en ciertos tipos de caracteres fisiológicos como la ubicación espacial, la cognición, las habilidades motoras, entre otros (Hossman, 2008; Murphy and Corbett, 2010).

En este estudio, la evaluación neurológica (Yrjanheikki, J. et al., 2005) tuvo en cuenta las habilidades motoras de los animales y como estos las habían perdido luego de la

isquemia cerebral. Los animales IP, los cuales muestran una deficiencia neurológica hasta aproximadamente 72 horas post-isquemia, mientras que los animales IA tienden a mejorar a las 24 horas para una recuperación casi completa a las 48 horas (Figura 9). Sin embargo, el análisis histológico reveló un daño celular marcado para estos animales IP. Esto puede ser explicado por estudios que han demostrado la existencia de mecanismos compensatorios dentro del sistema nervioso luego de una isquemia cerebral, donde la actividad de un hemisferio que ha sido afectado puede ser sustituida por la actividad del otro hemisferio (Murphy and Corbett, 2010).

Aunque el protocolo utilizado reúne siete puntos básicos para dar una referencia del estado neuromotor de los animales (Tabla 2). No es tan sensible como otras metodologías implementadas como la prueba neurológica compositiva (la cual posee 18 puntos más detallados para desordenes sensomotores), o el llamado neuropuntaje (el cual posee 28 puntos y es característico para evaluaciones motores y comportamentales post-isquemia), así como la prueba de relación de las extremidades anteriores de vibrisas evocadas, la prueba de fallos de los pies, entre otros (Encarnación et al., 2011). Sin embargo la prueba neurológica basada en el test de Yrjanheikki se trabajó debido a que dentro del grupo de neurociencias de Antioquia ya se han realizado trabajos en ratas con este protocolo que han mostrado resultados promisorios (Gutiérrez-Vargas et al., en preparación). Además, los resultados de la prueba muestran que esta no influye en los resultados obtenidos por el laberinto acuático de Morris, ya que la prueba visible evidencia que no hay efectos adversos para los animales IP en cuanto a visibilidad y comportamiento motor dentro del laberinto (Figura 20 D).

10. 3. LA ATORVASTATINA MANTIENE LA PROTECCIÓN NEURONAL LUEGO DE UNA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Se han realizado estudios que ha demostrado el efecto neuroprotector de las estatinas en diferentes modelos de isquemia cerebral y excitotoxicidad por glutamato (Van der Most et al., 2009). También se ha visto muy relacionada con el mejoramiento sensoriomotor, ejerciendo su efecto benéfico posiblemente sobre la inhibición de los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación luego de una hemorragia intracerebral (Jung et al., 2004).

En este estudio, los resultados obtenidos a nivel celular muestran que la atorvastatina revierte el daño en la morfología celular (Figuras 10-13). Además el marcaje con MAP-2, NeuN y fluorojade manifiesta que la atorvastatina restaura la estructura y evita la pérdida celular dando una continuidad a la inmunoreactividad en las proyecciones neuronales y disminuyendo también los niveles de acidosis metabólica ocasionada por la t-MCAO (Figuras 10-13). Estos resultados son concordantes con estudios previos realizados en nuestro laboratorio a 72 horas post-isquemia, donde se ha visto que la atorvastatina restablece la morfología neuronal, disminuye los marcadores de neurodegeneración y restablece las cantidades de proteínas de adhesión (Céspedes-Rubio et al., 2010). Inclusive, se ha reportado en experimentos *in vivo* que las estatinas como la atorvastatina (entre otras) incrementan la neurogénesis y la sinaptogénesis sin alterar las concentraciones fisiológicas de colesterol, lo que sugiere que estas promueven la neuroprotección por diferentes mecanismos moleculares (Lu et al., 2004; Van der Most et al., 2009).

Es importante mencionar, que en este estudio se observa que la atorvastatina mantiene su efecto neuroprotector a los 12 días post-isquemia, generando posiblemente una continua regulación sobre vías de supervivencia como PKB/Akt y liberación de factores tróficos como BDNF (Van der Most et al., 2009) para promover una dinámica de restauración de los tejidos infartados.

10. 4. LA EXPRESIÓN DE LOS COMPLEJOS NR2B/PSD-95 ES RESTABLECIDA POR LA ATORVASTATINA LUEGO DE UNA ISQUEMIA CEREBAL FOCAL

En este estudio, los resultados por inmunofluorescencia muestran que la intensidad de fluorescencia de la subunidad NR2B y de PSD-95 disminuye en animales IP, así mismo la relación área total/número total de cluster (Figura 17 A y D). También se observa que las cantidades de la subunidad NR2B y su asociación con PSD-95 disminuyen significativamente en estos animales. (Figura 17 B). Este fenómeno puede ser explicable en relación a los resultados obtenidos por diferentes autores que muestran que en isquemia cerebral la excitación excesiva de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B lleva a un incremento de Ca^{2+} en las neuronas post-sinápticas, lo cual activa a la proteasa dependiente de Ca^{2+} calpaina I. Esta corta a su vez las subunidades NR2A y NR2B en sus terminales carboxilo y también corta a PSD-95 desestabilizándola de la membrana, llevando también a la pérdida de los receptores NMDA (Gascon et al., 2008; Dhawan et al., 2010). Lo que puede evidenciar la pérdida de estas subunidades en animales IP a 12 días post-isquemia (Figura 17 A y D).

Muchos estudios en neuroprotección se han centrado básicamente en comparar descripciones morfológicas y cantidades de proteínas implicadas en regulación celular y supervivencia cuando ha ocurrido un evento isquémico y comparar estos fenómenos luego del tratamiento con estatinas (Yrjanheikki, J. et al., 2005; Van der Most et al., 2009; Céspedes-Rubio et al., 2010). Aunque se han realizado estudios que tratan de elucidar los mecanismos fisiológicos y moleculares por los cuales las estatinas actúan (Chen et al., 2003; Lu et al., 2004; Van der Most et al., 2009). Para este estudio, el tratamiento con atorvastatina no solamente provoca un restablecimiento de la intensidad de fluorescencia (Figura 17 A), también promueve una recuperación del área total de clusters en relación al número total de estos para las proteínas NR2B y PSD-95 (Figura 17 D). Inclusive genera que los niveles de la subunidad NR2B y su asociación con PSD-95 sean similares a los animales controles SP y SA (Figura 17 B). Esto debido posiblemente por la regulación de la liberación de diferentes factores tróficos como el BDNF que promueven y modulan la actividad del receptor NMDA y sus complejos con

PSD-95 a través de diferentes vías de señalización que involucran diferentes canales iónicos, receptores TrkB, vías de supervivencia como PKA/Akt y protooncogenes como Fyn para tratar de regular el insulto excitotóxico (Van der Most et al., 2009; Cunha et al., 2010) lo que hace que no haya un retroceso del daño a lo largo del tiempo y sin la generación de conexiones aberrantes llevando a una recuperación funcional completa.

10. 5. LOS NIVELES DE BDNF EN LA CORTEZA CEREBRAL SON RESTABLECIDOS POR LA ATORVASTATINA LUEGO DE UNA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

El BDNF es una neurotrofina muy importante dentro del sistema nervioso. Esta molécula está implicada en la regulación transcripcional de varias rutas de supervivencia a través de factores de transcripción como CREB localizándose en compartimientos pre y post-sinápticos y actuando en señales autocrinas y paracrinas dependiendo del sitio donde estén sus receptores en la superficie celular a la cual señala (Murer et al., 2001). La liberación dependiente de actividad de BDNF puede ocurrir de tres formas diferentes: 1) Liberación dependiente del influjo de Ca^{2+} desde los sitios post-sinápticos mediado por receptores ionotrópicos de glutamato, 2) Liberación dependiente del influjo de Ca^{2+} y 3) Liberación dependiente del influjo de Ca^{2+} a partir de los almacenamientos intracelulares de este (Griesbeck et al., 1999; Hartmann et al., 2001; Balkowiec and Katz, 2002).

Lo que nuestros resultados muestran, es que la inducción de una isquemia cerebral disminuye de forma significativa los niveles de BDNF en la corteza cerebral (Figura 18 A). Esto ya ha sido reportado en estudios anteriores donde se ha visto que los niveles del mRNA de BDNF disminuyen luego de una isquemia moderada (Schmidt-Kastner et al., 2001). Sin embargo, lo importante a rescatar es la recuperación de los niveles de BDNF en corteza luego del tratamiento con atorvastatina (Figura 17 C). Esto da luz al mecanismo por el cual la atorvastatina puede regular la expresión y asociación de proteínas como NR2B y PSD-95 para garantizar que las neuronas generen nuevas

conexiones neuronales (sinaptogénesis) y se regulen las corrientes postsinápticas excitatorias mediadas por los receptores NMDA a través del mantenimiento de factores tróficos como BDNF. En el hipocampo también se encontró que la concentración de BDNF disminuye de forma significativa para los animales IP comparados con los animales SP (Figura 18 A). Pero a pesar de los resultados promisorios encontrados en la corteza cerebral luego de 12 días post-isquemia para neuroprotección con atorvastatina (Figura 17 C), los niveles de BDNF en hipocampo no llegaron a la cantidad de los controles. Esto concuerda con resultados obtenidos para neuroprotección con estatinas donde se ha visto que estas promueven la expresión de BDNF luego de un daño cerebral traumático (Wu et al., 2008). Sin embargo hay que tener en cuenta que un daño cerebral traumático es mucho más marcado, lo cual muestra de la necesidad de incrementar los niveles de BDNF en el cerebro promovido luego del uso de la atorvastatina. También, esto podría explicarse debido a que los niveles de BDNF en corteza pueden ser suficientes para modular los circuitos neuronales en el hipocampo, inclusive puede explicarse por la presencia de células GABAérgicas dentro de este que pueden modular la excitotoxicidad promoviendo que el daño celular en los circuitos hipocámpales no se haya visto tan drástico. Además, los resultados de la inmunoprecipitación para hipocampo no muestran ninguna variación significativa en cantidades de la subunidad NR2B y su asociación con PSD-95 para ningún de los tratamientos. Esto puede ser debido a que la redundancia de la red neuronal puede generar mecanismos de retroalimentación (positiva y negativa) por si misma que regulen el daño en diferentes zonas cerebrales a través de la comunicación autocrina y paracrina de diferentes moléculas manteniendo su cantidad y actividad (Pozo and Goda, 2010).

10. 6. EL DAÑO EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL GENERADO POR LA ISQUEMIA CEREBRAL ES REVERTIDO LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ATORVASTATINA

Los resultados obtenidos por el laberinto acuático de Morris muestran un claro daño cognitivo en los animales IP, ya que estos animales muestran un incremento en los tiempos de latencia en el aprendizaje (Figura 19 A) y la memoria espacial (Figura 20 A) de forma significativa. Esto es coherente con diferentes estudios realizados donde se muestra que la isquemia cerebral provoca un daño en el aprendizaje y la memoria evidenciado también por el laberinto acuático de Morris (Briones et al., 2006; Gutiérrez-Vargas et al., 2010). Cuando se observan los resultados para los animales IA, se ve que el tratamiento con atorvastatina restaura el daño en estos animales disminuyendo los tiempos de latencia para el aprendizaje (Figura 19 A) y memoria espacial (Figura 20 A), lo que sugiere que la recuperación celular (evidenciado por Nissl, MAP-2, NeuN y fluorojade) (Figuras 10-16) y molecular (asociación de NR2B/PSD-95) (Figuras 17-18) que la atorvastatina ejerce sobre de los niveles de BDNF en la corteza cerebral pueden actuar sobre la expresión y asociación de los receptores NMDA modulando sus complejos con PSD-95 tanto en corteza como en hipocampo, regulando las vías de supervivencia neuronales y generando procesos de sinaptogénesis regulados llevando a una recuperación funcional evidenciada por el laberinto acuático de Morris.

11 CONCLUSIONES

- La acción neuroprotectora de la atorvastatina recupera y mantiene hasta 12 días post-isquemia la morfología y la estructura neuronal en la corteza motora primaria y secundaria, el putamen caudado, en la corteza piriforme y en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo.
- La acidosis metabólica generada en la corteza piriforme y el putamen caudado a 12 días post-isquemia es revertida tras el tratamiento con atorvastatina.
- La atorvastatina promueve la restauración total de los complejos NR2B/PSD-95 en animales isquémicos.
- La atorvastatina restaura los niveles de BDNF en la corteza cerebral luego de una isquemia cerebral focal.
- El daño en el aprendizaje y memoria espacial es mejorado significativamente tras el tratamiento con atorvastatina a 12 días post-isquemia y esta recuperación funcional esta correlacionada con la modulación de los complejos NR2B/PSD-95 y el incremento en los niveles de BDNF.

12. PERSPECTIVAS

Dentro del estudio, quedan bastantes ideas que pueden tratar de elucidar el mecanismo exacto por el cual la atorvastatina conlleva a una recuperación funcional luego de un evento isquémico:

- a. Ensayos de inmunoprecipitación de proteínas como TrkB (receptor de BDNF) para evidenciar una asociación presentada con NR2B, PSD-95 y BDNF.

- b. A partir de estos resultados, teniendo como base la mejor relación entre los tratamientos (SP, SA, IP, IA), realizar ensayos por microscopia confocal de inmunofluorescencia para BDNF y observar su localización subcelular con proteínas como NMDA (NR1, NR2A y NR2B) y PSD-95.

Estos ensayos encaminados a evidenciar el papel que la atorvastatina su efecto neuroprotector. Ejercido como modulador de la actividad de receptores NMDA a través del BDNF.

Otras ideas derivadas pueden darse a partir de los resultados en hipocampo:

- a. La relación de la expresión de BDNF en corteza y la actividad de las neuronas GABAérgicas en hipocampo y la modulación que estas puedan ejercer en la actividad y/o internalización de las subunidades de NMDA (NR1-NR2) dado por la acción neuroprotectora de la atorvastatina.

- b. Papel de plasticidad sináptica con redes GABAérgicas y excitatorias luego del tratamiento con atorvastatina en una isquemia cerebral llevando a una mejoría funcional.

13. BIBLIOGRAFIA

- Anastasiadis, P.Z. (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 34–46.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe J. (2007). *The hippocampus book*. Oxford university press, Inc. 198 Madison avenue, New York. United States of America.
- Arundine M, Tymianski M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61: 657–668.
- Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Kelly, J.F., Evans, D.A., Bennett, D.A. (2008). Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function and neuropathology. *Neurology* 70: 1795–1802.
- Baird, A. (1993). Fibroblast growth factors: what's in a name? *Endocrinology*. 82: 487-488.
- Baron, J. C., von Kummer, R. and del Zoppo, G. J. (1995). Treatment of acute ischemic stroke. Challenging the concept of a rigid and universal time window. *Stroke* 26 (12): 2219-21.
- Bats, C., Groc, L., Choquet, D., (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53: 719–734.
- Beique, J.C. and Andrade, R. (2003). PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 546: 859–867.
- Berberich, S., Jensen, V., Hvalby, Ø., Seeburg, P.H., Kohr, G. (2006). The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction. *Neuropharmacology* xx 1e10.

- Berger, C., Xia, F., Maurer, M.H., Schwab, S. (2008). Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Res. Rev.* 58: 48–56.
- Bliss, T.V., and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 331–356.
- Bosel, J., Gandor, F., Harms, C., Synowitz, M., Harms, U., Djoufack, P. C., Megow, D., Dirnagl, U., Hortnagl, H., Fink, K. B. and Endres, M. (2005). Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem* 92 (6): 1386-98.
- Briones, T.L., Suh, E., Jozsa, L., Woods, J. (2006). Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. In: *Experimental Neurology*. 198 (2): 530–538.
- Brown, M.W., Aggleton, J.P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2: 51–61.
- Burgess, N., Maguire, E. A., O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35: 625-641.
- Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Cupini, L. M., and Bernardi, G. (2003). Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *THE LANCET Neurology* Vol 2.
- Castilla, G.L., Del Carmen, Fernández, M.M., López, Chozas, J.M., Jiménez, H., (2008). Statins in stroke prevention: what an internist should know. *Eur. J. Intern. Med.* 19: 8–14.
- Céspedes-Rubio, A., Wandosell-Jurado F., Cardona-Gómez G.P. (2010). p120 Catenin/aN-Catenin Are Molecular Targets in the Neuroprotection and Neuronal

- Plasticity Mediated by Atorvastatin After Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience Research* 88 (16): 3621-34.
- Chatterton, J.E., Awoboluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., et al. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptors subunits. *Nature* 415: 793-798.
- Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, Y., Wang, L., Jiang, H., Zhang, C., Lu, M., Katakowski, M., Feldkamp, C.S., Chopp, M. (2003). Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann. Neurol.* 53: 743–751.
- Chen, J., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Zhang, L., Robin, A., Katakowski, M., Lu, M., Chopp, M. (2005). Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 281–290.
- Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold R.J., Brecht, D.S., Nicoll, R.A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936–943.
- Choi, D. W. and Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-82.
- Christie, J.M., and Jahr, C.E. (2008). Dendritic NMDA Receptors Activate Axonal Calcium Channels. *Neuron* 60: 298–307.
- Cimino, M., Gelosa, P., Gianella, A., Nobili, E., Tremoli, E. and Sironi, L. (2007). Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. *Neuroscientist* 13 (3): 208-13.
- Costain, Willard J., Rasquinha, Ingrid., Sandhu, Jagdeep K., Rippstein, Peter., Zurakowski, Bogdan., Slinn, Jacqueline., MacManus, John P., and Stanimirovic. (2008). Cerebral ischemia causes dysregulation of synaptic adhesion in mouse synaptosomes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2008) 28: 99–110.

- Curtis de, Ivan. (2007). Intracellular mechanisms for neuritogenesis. Springer Science+business Media LLC. All rights reserved.
- Cunha, C., Branbilla, R., Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci.* 9 (3): 1.
- Danica B. (2008). Cerebral ischemia causes dysregulation of synaptic adhesion in mouse synaptosomes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 28: 99–110.
- Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White (2008). *Neuroscience*. Sunderland, MA U.S.A.
- De Simoni, A., Griesinger, C.B., and Edwards, F.A. (2003). Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J. Physiol.* 550: 135–147.
- Desai, N.S., Cudmore, R.H., Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (2002). Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 5: 783–789.
- Dhawan, J., Benveniste, H., Nawrocky, M., David-Smith, S., Biegon, S. (2010). Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors. *NeuroImage* 51: 599–605.
- Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rutten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H., Zeiher, A.M. (2001). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 108: 391–397.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22 (9): 391-7.

- D'Hooge, R., and De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36: 60–90.
- Dugan, L.L., and Choi, D.W. (1994). Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann. Neurol* 35: S17–S21.
- Durucan, A., and Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 87 (1): 179-97.
- Eggermont, L., Swaab, D., Luiten, P., Scherder, E. (2006). Exercise, cognition and Alzheimer's disease: more is not necessarily better. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30: 562–575.
- Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J., Traynelis, S.F., (2005). Subunit specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J. Physiol.* 563: 345e358.
- Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl (2003). *Current Protocol in Molecular Biology*. Wiley Interscience. 10.05 – 10.8.17.
- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Murakami, K., Kawase, M., and Chan, P.H. (1998). Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 1239–1247.
- Gao, J., Duan, B., Wang, D., Deng, X., Zhang, G., Xu, L., Xu, T. (2005). Coupling between NMDA Receptor and Acid-Sensing Ion Channel Contributes to Ischemic Neuronal Death. *Neuron* 48: 635–646.
- Gao T.M., and Xu Z.C. (1996). In vivo intracellular demonstration of an ischemia-induced postsynaptic potential from CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 75: 665–69.

- Gascón, S., Sobrado, M., Roda, JM., Rodríguez-Peña, A., Díaz-Guerra D. (2008). Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Molecular Psychiatry*. 13: 99–114.
- Geiger, J.R.P., Melcher, T., Koh, D.-S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P. and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204.
- Ginsberg, M. D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology* 55(3): 363-389.
- Gutiérrez-Vargas Johanna., Castro-Álvarez John Fredy., Velásquez-Carvajal David., Montañes-Velásquez Maria Natalia., Céspedes- Rubio Angel., Cardona- Gómez Gloria Patricia. (2010). Rac1 activity changes are associated with neuronal pathology and spatial memory long-term recovery after global cerebral ischemia. *Neurochemistry International* 57: 762–773.
- Guttmann, R. P., Baker, D. L., Seifert, K. M., Cohen, A. S., Coulter, D. A. and Lynch, D. R. (2001). Specific proteolysis of the NR2 subunit at multiple sites by calpain. *J Neurochem* 78 (5): 1083-93.
- Henson, M. A; Roberts, A. C., Perez-Otaño, I., Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor function. *Progress in neurobiology* 91: 23-37.
- Hernandez-Romero, M. C., Arguelles, S., Villaran, R. F., de Pablos, R. M., Delgado-Cortes, M. J., Santiago, M., Herrera, A. J., Cano, J. and Machado, A. (2008). Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. *J Neurochem* 105 (2): 445-59.

- Hoglund, K., and Blennow, K., (2007). Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on beta-amyloid peptide levels: implications for Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 21: 449–462.
- Hollmann, M. and Hernemann, S. Cloned Glutamate Receptors. (1994). *Annual Review of Neuroscience* 17: 31-108.
- Hoogenraad, C.C., and Bradke, F. (2009). Control of neuronal polarity and plasticity – a renaissance for microtubules?. *Trends in Cell Biology* 19 (12): 669- 676.
- Hossman, K.A. (2008). Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55: 257-270.
- Hou, Sheng T., and MacManus, John P. (2002). Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *International Review of Cytology* 221: 93-148.
- Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Peel, A., Ou-Mao, X., Bateur, S., Greenberg, D. (2003). Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24: 171–189.
- Joep, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E. (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32: 577–595.
- Jourdain, P., Nikonenko, I., Alberi, S., Muller, D. (2002). Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci* 22: 3108–16.
- Jung, Y.J., Park, S.J., Park, J.S., Lee, E.K. (2004). Glucose/oxygen deprivation induces the alteration of synapsin I and phosphosynapsin. *Brain Research* 996: 47–54.
- Jung, K.H., Chu, K., Jeong, S.W., Han, S.Y., Lee, S.T., Kim, J.Y., Kim, M., Roh, J.K. (2004). HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery,

- suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage, *Stroke* 35: 1744–1749.
- Katsura, K., Kristian, T., and Siesjo, B.K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis and cell damage in the brain. *Biochem. Soc. Trans* 22: 991–996.
- Khaja, A.M., and Grotta, J.C. (2007). Established treatments for acute ischemic stroke. *Lancet* 369: 319-330.
- Kimura, R., and Matsuki, N. (2008). Protein kinase CK2 modulates synaptic plasticity by modification of synaptic NMDA receptors in the hippocampus. *J Physiol* 586 (13): 3195–3206.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. & Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737–1740.
- Kristian, T., and Siesjo, B.K. (1998). Calcium in Ischemic Cell Death. *Stroke* 29: 705–718.
- Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (1999). Interactions of Calmodulin and α -Actinin with the NR1 Subunit Modulate Ca^{2+} -Dependent Inactivation of NMDA Receptors. *J. Neurosci* 19: 1165-1178.
- Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., Sessa, W.C., Walsh, K. (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 6: 1004–1010.
- Ladecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20: 132–139.

- Lerouet, D., Beray-Berthat, V., Palmier, B., Plotkine, M., Margaille, I. (2002). Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 958 (1): 166-175.
- Lessmann, V., Gottmann, K., and Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69: 341–374.
- Liao, J.K. (2002). Statins and ischemic stroke. *Atherosclerosis Supplements* 3: 21-25.
- Liao, J.K. (2005). Effects of Statins on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibition beyond Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *The American Journal of Cardiology* 96 (5A): 24-33F.
- Lin, Y., Jover-Mengual, T., Wong, J., Bennett, M.V., Zukin, R.S. (2006). PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 19902–19907.
- Lipton, S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Discov* 5: 160-170.
- Lo, E.H., Dalkara, T., Moskowitz, M.A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4: 399-415.
- Lo, E. H. (2008a). Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S396-405.
- Lo, E. H. (2008b). A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14 (5): 497-500.
- Lohmann, C. (2009). Calcium signaling and the development of specific neuronal connections. *Prog Brain Res* 175: 443-52.
- Lu, D., Goussev, A., Chen, J., Pannu, P., Li, Y., Mahmood, A., Chopp, M. (2004). Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angio-

- genesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 21: 21–32.
- Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., Mahmood, A., Chen, J., Li, Y., Chopp, M. (2007). Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24: 1132–1146.
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87–136.
- Madden, D. R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci* 3: 91-101.
- Martin Henry G.S. and Wang Yu Tian. (2010). Blocking the Deadly Effects of the NMDA Receptor in Stroke. *Cell* 140 (2): 174-176.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G., and Cowan, A.I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17: 251–257.
- McCue, H. V., Haynes, L. P. and Burgoyne, R. D. (2010). The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (8): a004085.
- Mehta, Suresh L., Manhas, Namratta., Raghubir, Ram. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *BRAIN RESEARCH REVIEWS* 54: 34–66.
- Montori, Sheyla, Dos-Anjos, Severiano., Martínez-Villayandre, Beatriz., Regueiro-Purriños c, Marta M., Gonzalo-Orden c, José M., Ruano d, Diego., Fernández-López, Arsenio. (2010). Age and meloxicam attenuate the ischemia/reperfusion-induced down-regulation in the NMDA receptor genes. *Neurochemistry International* 56 (8): 878-885.

- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11: 47–60.
- Murphy, T., H. and Corbett, C. (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behavior. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 861-872.
- Nassief, A., Marsh, J.D., (2008). Statin therapy for stroke prevention. *Stroke* 39: 1042–1048.
- Nehls, D.G., Park, C.K., and McCulloch, J. (1989). Cerebral circulatory effects of Dizocilpine (MK-801) in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 9: S376–S376.
- Olney, J. W. and Sharpe, L. G. (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166 (903): 386-8.
- OLYMPUS. Applications in Confocal Microscopy. Colocalization of Fluorophores in Confocal Microscopy. [Online]. OLYMPUS CORPORATION 2004-2007. Fecha de actualización. Idioma Español e Inglés. Disponible en Internet: <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/confocal>>.
- Organización Mundial de Salud pública, un atlas decisivo sobre la epidemia mundial de cardiopatías y accidentes cerebrovasculares. (2004). Disponible en: www.worldheart.org/pdf/press.releases.who.cvd.atlas.spanish.pdf.
- Ovbiagele, B., Saver, J. L., Starkman, S., Kim, D., Ali, L. K., Jahan, R., Duckwiler, G. R., Vinuela, F., Pineda, S. and Liebeskind, D. S. (2007). Statin enhancement of collateralization in acute stroke. *Neurology* 68 (24): 2129-31.
- Patterson, P. H., Nawa, H. (1993). Neuronal differentiation factors, cytokines and synaptic plasticity. *Cell* 72: 123-137.
- Perel, P., Roberts, I., Sena, E., Wheble, P., Briscoe, C., Sandercock, P., Macleod, M., Mignini, L., Jayaram, P., Khan, K., (2007). Comparison of treatment effects between

- animal experiments and clinical trials: systematic review. *British Medical Journal* 334: 197e200.
- Pérez-Otaño Isabel and D. Ehlers Michael. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *TRENDS in Neurosciences* 28 (5): 229-238.
- Pozo Karine and Goda Yukiko. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* 66: 337-351.
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S.,Wenthold, R.J., (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* 47: 845–857.
- Rabinowitch, I., and Segev, I. (2006). The interplay between homeostatic synaptic plasticity and functional dendritic compartments. *J. Neurophysiol* 96: 276–283.
- Rabinowitch, I., and Segev, I. (2008). Two opposing plasticity mechanisms pulling a single synapse. *Trends Neurosci* 31: 377–383.
- Rivera-Lee y Lopez-Colome. (2005). Relación de la estructura de los receptores NMDA con su función en la retina. In: *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas* 8 (002): 71-81.
- Roche, K.W., Standley, S.,McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers,M.D.,Wenthold, R.J., (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci* 4: 794–802.
- Sacco, R.L., Chong, J.Y., Prabhakaran, S., Elkind, M.S.V. (2007). Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 369: 331-341.
- Salins, P., Shawesh, S., He, Y., Dibrov, A., Kashour, T., Arthur, G., Amara, F. (2007). Lovastatin protects human neurons against Abeta-induced toxicity and causes activation of beta-catenin-TCF/LEF signaling. *Neurosci. Lett* 412: 211–216.

- Salinas, Patricia C., and Price, Stephen R. (2005). Cadherins and catenins in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology* 15:73–80.
- Sheng, M. and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24: 1-29.
- Schluter, O.M., Xu, W., Malenka, R.C. (2006). Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* 51: 99–111.
- Schmued, Larry C., and Hopkins, Keri J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. In: *Brain Research* 874: 123-130.
- Simon, R. P., Griffiths, T., Evans, M. C., Swan, J. H. and Meldrum, B. S. (1984). Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 4 (3): 350-61.
- Simpkins, K. L., Guttman, R. P., Dong, Y., Chen, Z., Sokol, S., Neumar, R. W. and Lynch, D. R. (2003). Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23 (36): 11322-31.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177.
- Stark, Craig E.L., and Squire, Larry R. (2003). Hippocampal Damage Equally Impairs Memory for Single Items and Memory for Conjunctions. *HIPPOCAMPUS* 13: 281–292.
- Stein, V., House, D.R., Bredt, D.S. & Nicoll, R.A. (2003). Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J. Neurosci* 23: 5503–5506.

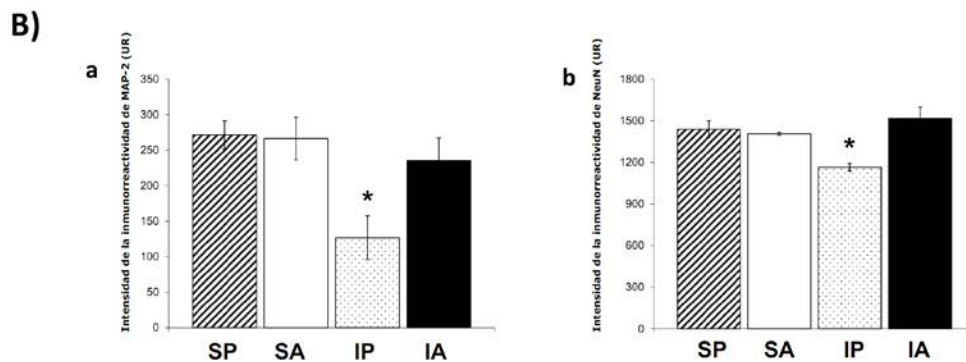
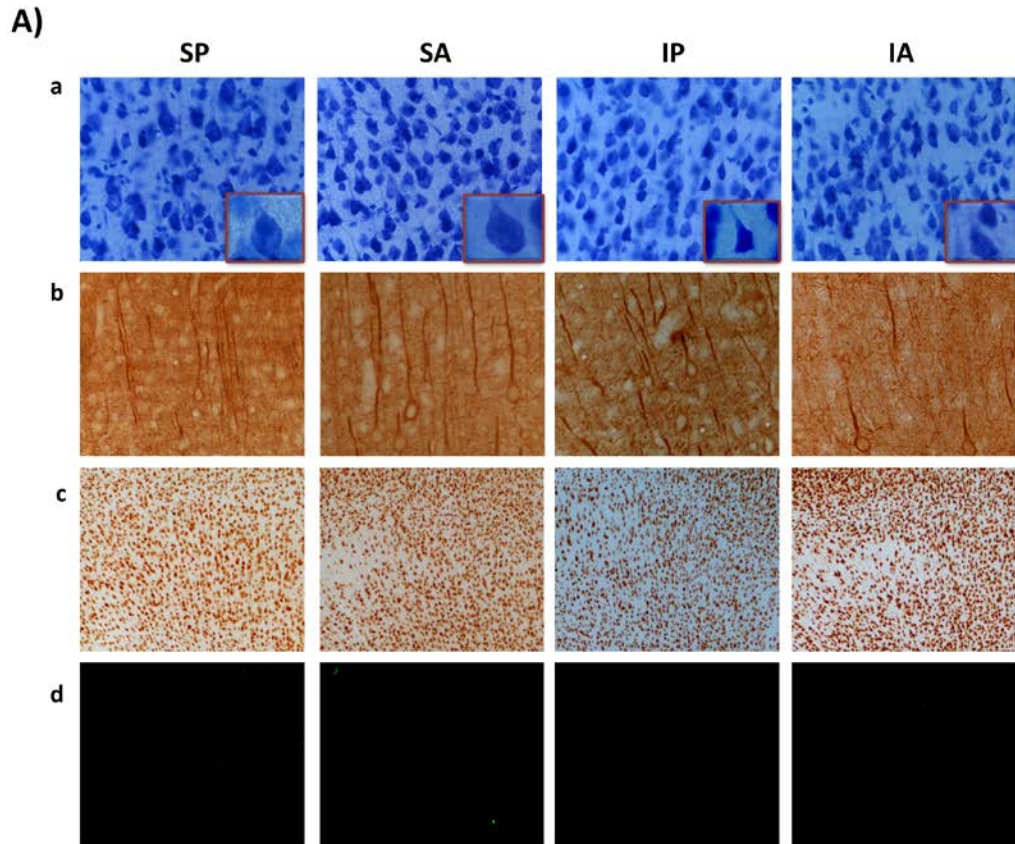
- Sun, M.K., Hongpaisan, J., Nelson T.J., Alkon D.L. (2008). Poststroke neuronal rescue and synaptogenesis mediated in vivo by protein kinase C in adult brains. *PNAS* 105 (36): 13620-13625.
- Szydłowska, K. and Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47 (2): 122-9.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) *New Engl. J. Med* 333: 1581–1587.
- Van der Most, P.J., Dolga, A.M., Nijholt, I. M., Luiten, Paul G.M., Eisel, Ulrich L.M. (2009). Statins: Mechanisms of neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 88: 64–75.
- Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols* 1 (2): 848-858.
- Wang Chao-Yung., Liu Ping-Yen., and Liao James K. (2007). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *TRENDS in Molecular Medicine* 14 (1): 37-44.
- Wang, C. Y., Liu, P. Y. and Liao, J. K. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* 14(1): 37-44.
- Wang, J., Liu, S.H., Fu, Y.P., Wang, J.H., Lu, Y. (2003). Cdk5 activation induces CA1 pyramidal cell death by direct phosphorylation of NMDA receptors. *Nat. Neurosci* 6: 1039-1047.
- Wappler, E. A., Felszeghy, K., Szilágyia, G., Gál A. (2010). Neuroprotective effects of estrogen treatment on ischemia-induced behavioural deficits in ovariectomized gerbils at different ages. *Behavioural Brain Research* 209: 42–48.

- Wenthold, R. J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. and Petralia, R. S. (2003). Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 335-58.
- Won, S. J., Kim, D. Y. and Gwag, B. J. (2002). Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* 35 (1): 67-86.
- Wu, D. (2005). Neuroprotection in Experimental Stroke with Targeted Neurotrophins. *NeuroRx* 2 (1): 120-128.
- Wu, H., Lu, D., Jiang, H., Xiong, Y., Qu, C., Li, B., Mahmood, A., Zhou, D., Chopp, M. (2008). Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 25: 130–139.
- Yang, J., Siao, C. J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z. Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., and Hempstead, B. L. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12: 113–115.
- Yrjänheikki, J., Koistinaho, J., Kettunen, M., Kauppinen, R. A., Appel, K., Hüll, M., Fiebich, B. L. (2005). Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Research* 1052 (29): 174-179.
- Yuen, E. C. and Mobley, W. C. (1996). Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Annals of Neurology* 40 (3): 346-355.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2005). Neurogenesis in the Adult Ischemic Brain: Generation, Migration, Survival, and Restorative Therapy. *The Neuroscientist* 11 (5): 408-416.
- Zhang, Y., Pardridge, W.M. (2001). Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood–brain barrier drug targeting system. *Stroke* 32: 1378–1384.

Zhang, X., Deguchi, K., Yamashita, T., Ohta, Y., Shang, J., Tian, F., Liu, N., Lukic-Panin, V., Ikeda, Y., Matsuura, T., Abe, T. (2010). Temporal and spatial differences of multiple protein expression in the ischemic penumbra after transient MCAO in rats. *Brain Research* 1343: 143-152.

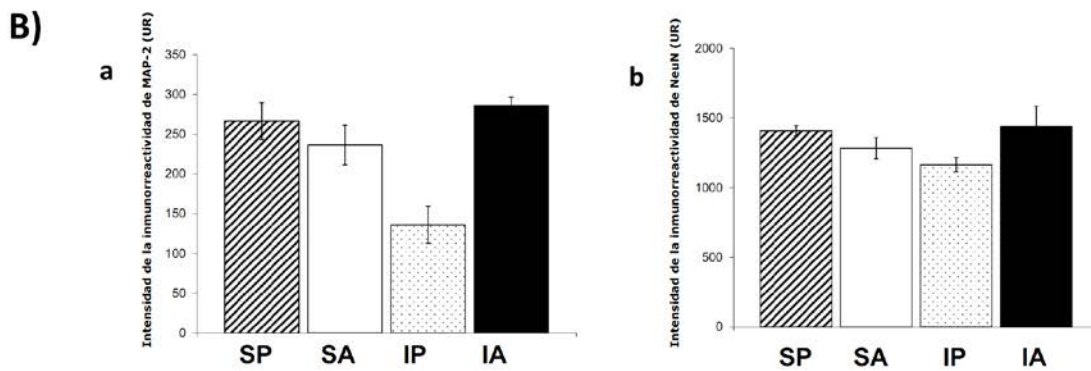
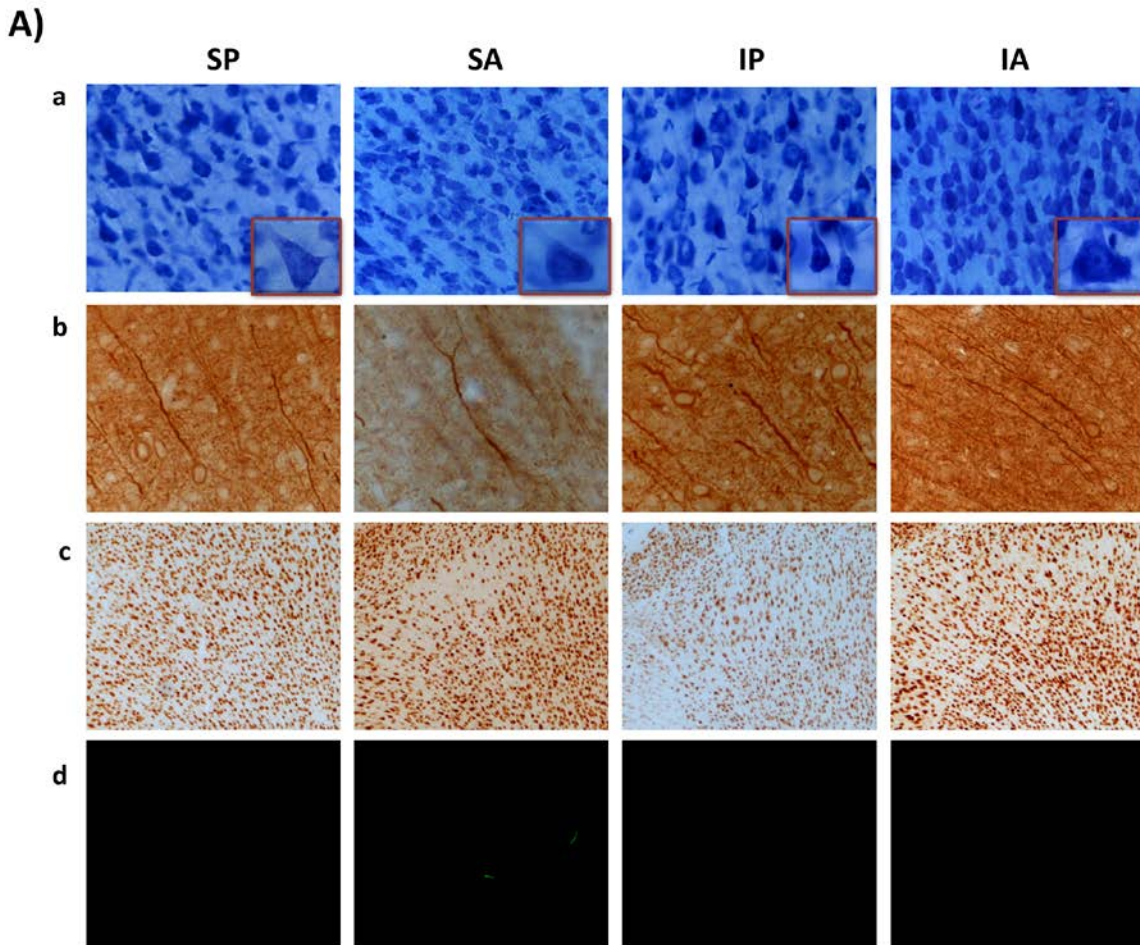
14. ANEXOS

Anexo 1. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la corteza motora primaria luego de una ischemia cerebral focal.



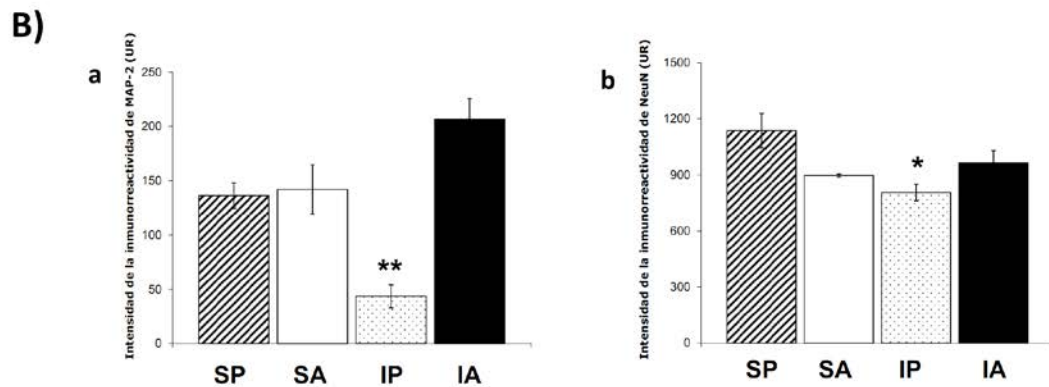
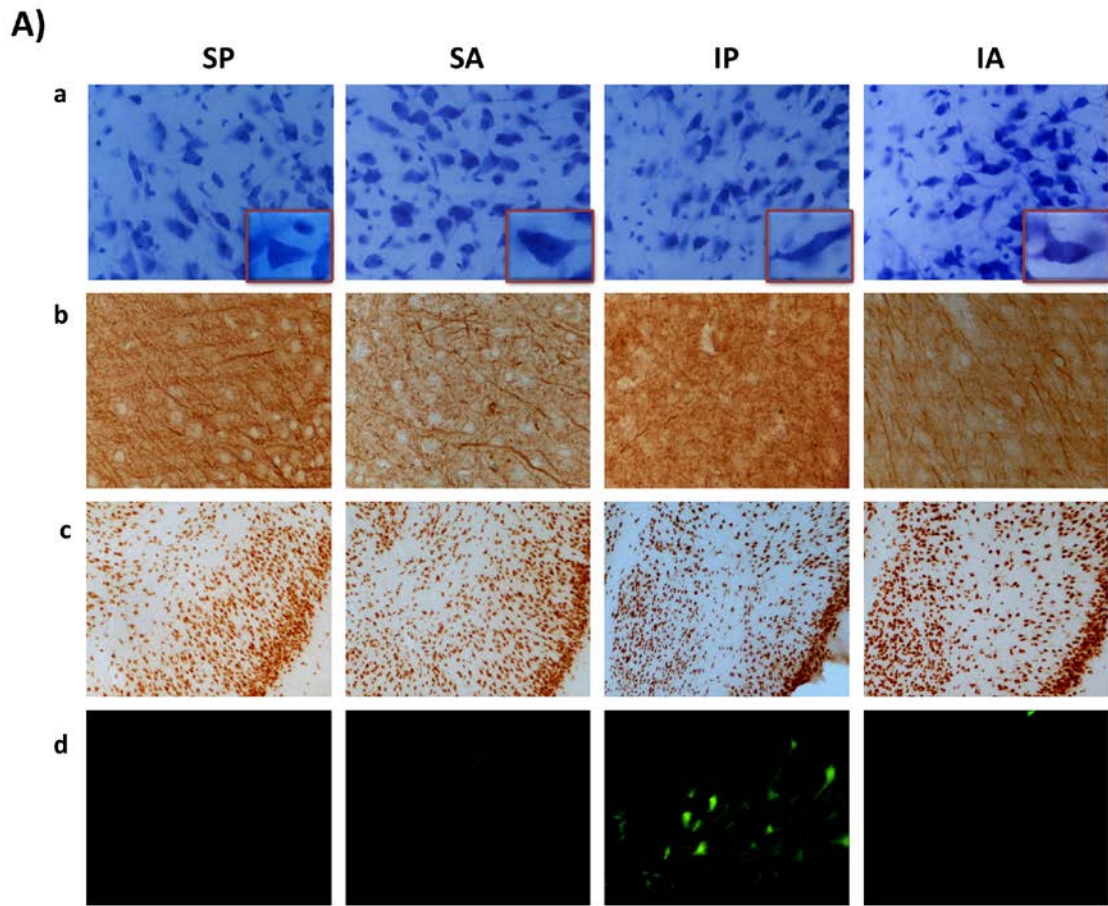
A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.05 = *$).

Anexo 2. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la corteza motora secundaria luego de una isquemia cerebral focal.



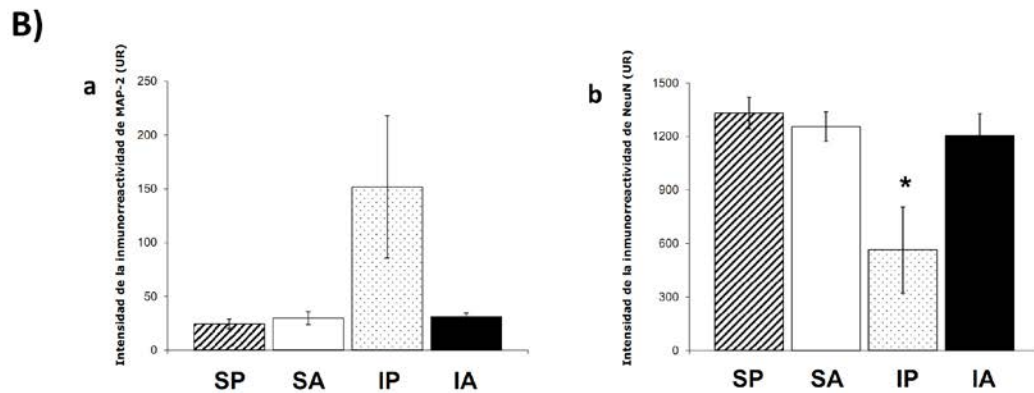
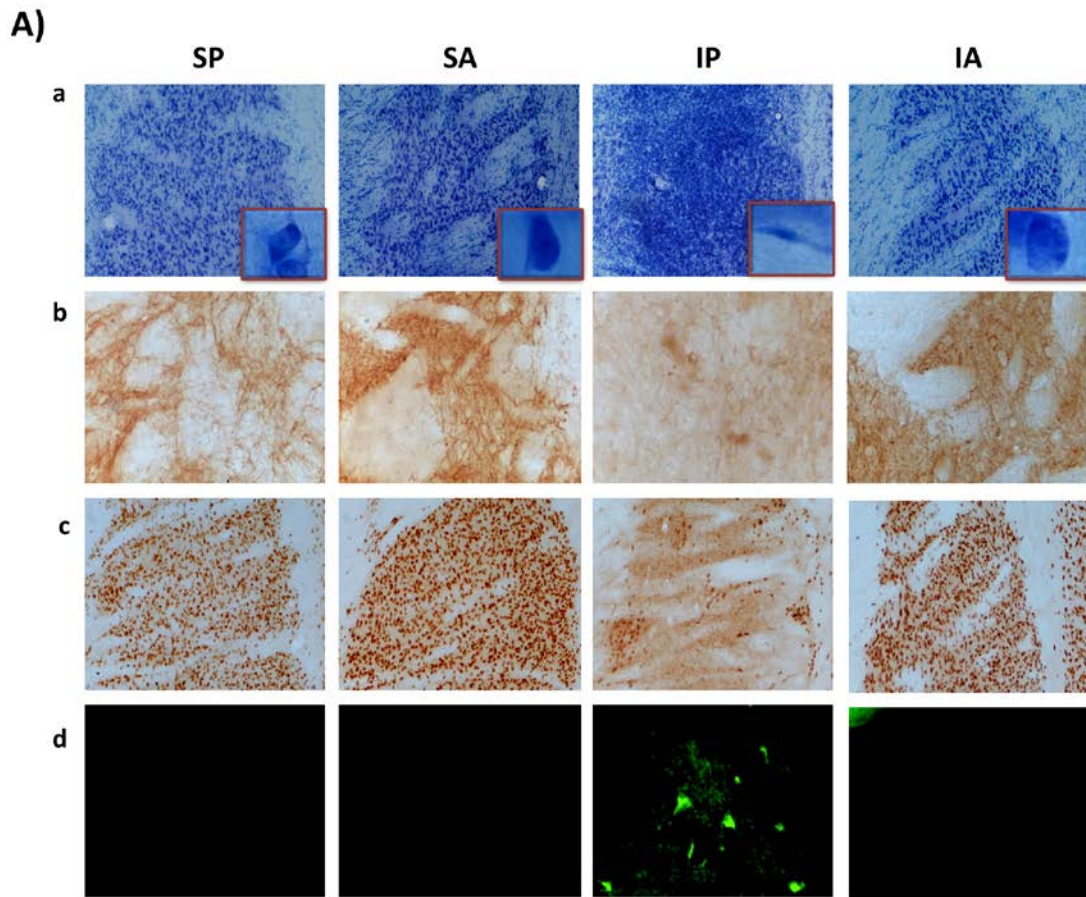
A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a)Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN.

Anexo 3. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la corteza piriforme luego de una ischemia cerebral focal.



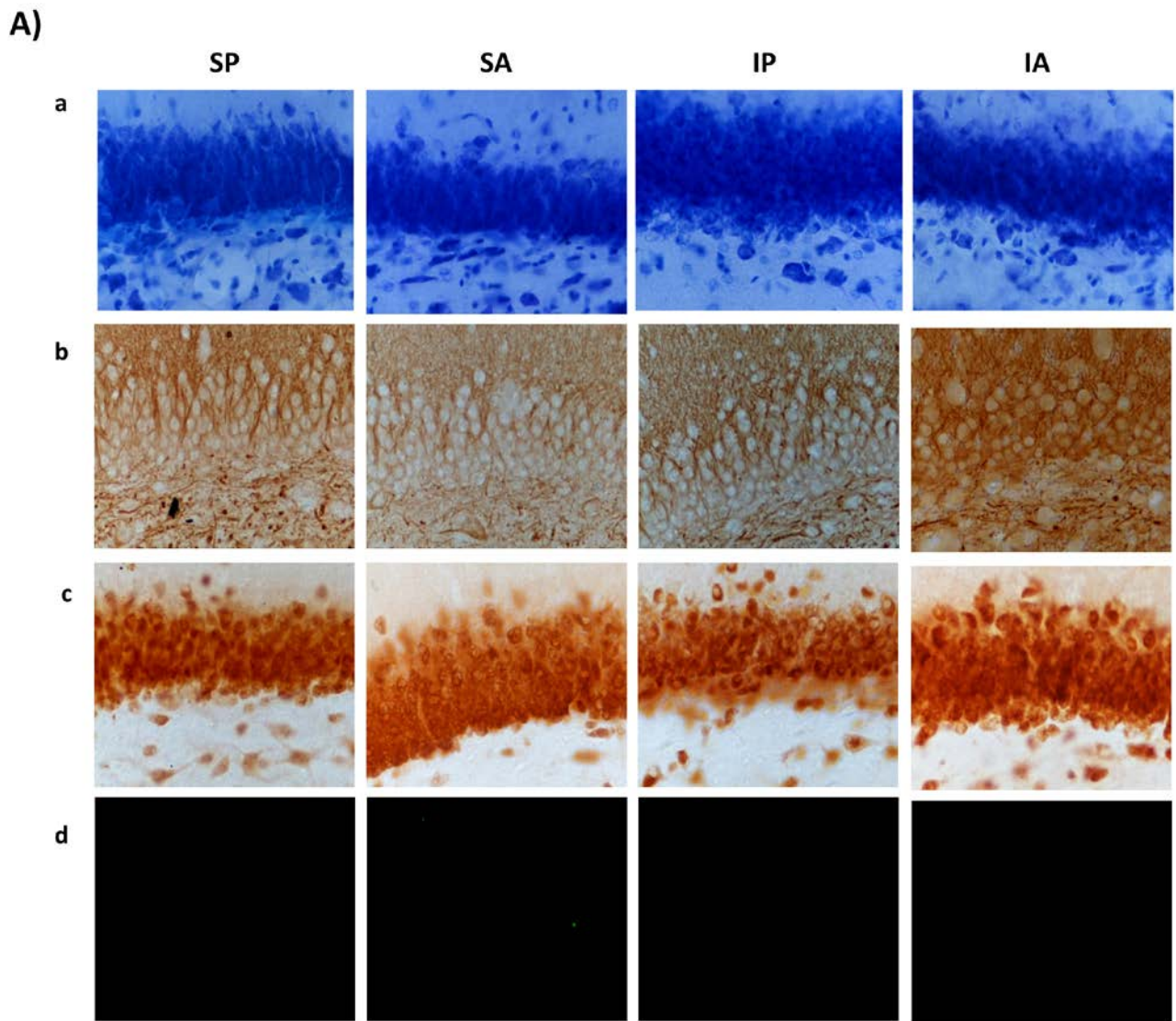
A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a)Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.00 = **$; $p < 0.05 = *$).

Anexo 4. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para el putamen caudado luego de una isquemia cerebral focal.



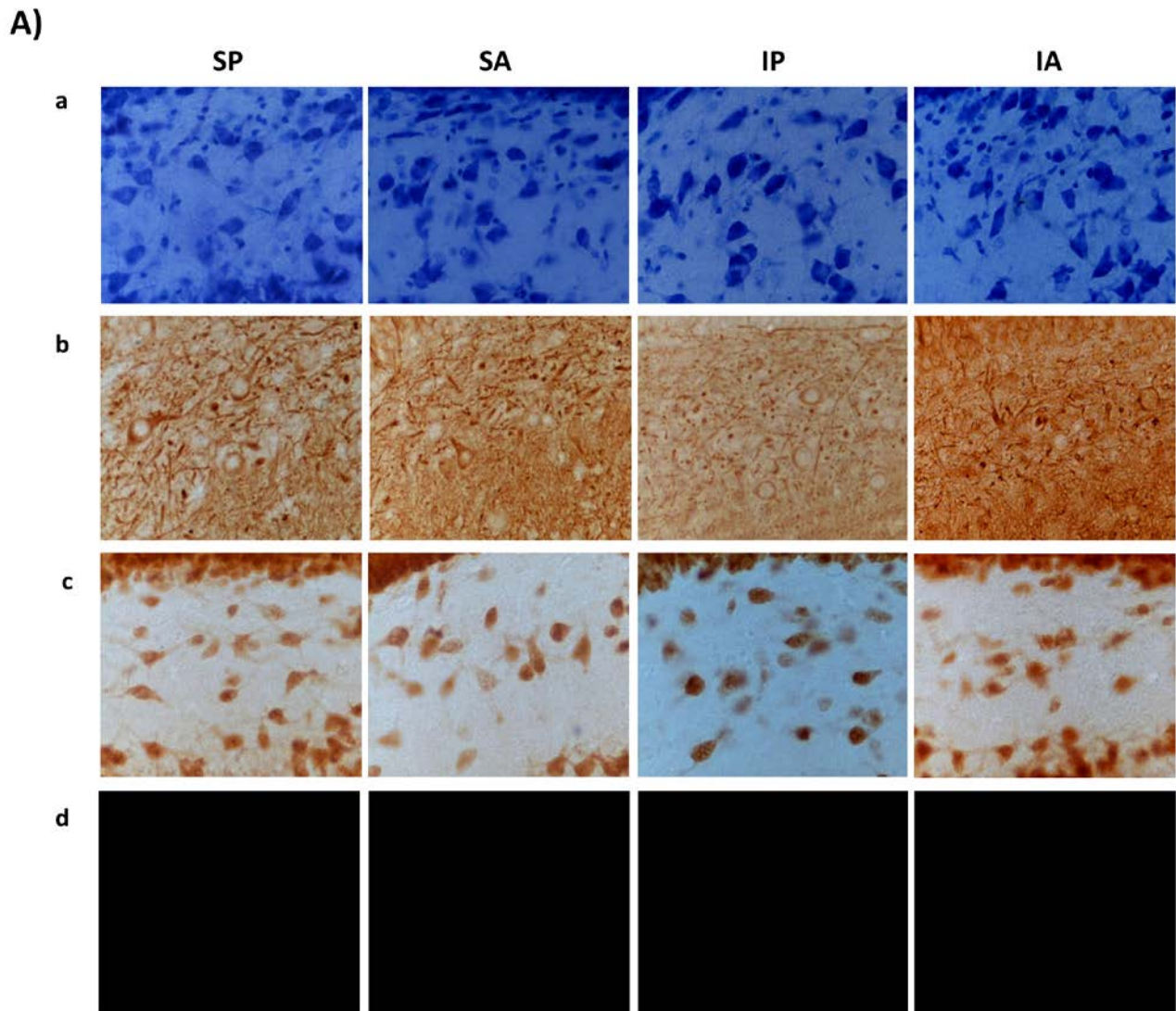
A) Imágenes representativas del brema (-3.60) para la tinción de a)Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA. B) Inmunorreactividad de a) MAP-2 y b) NeuN. ($p < 0.05 = *$).

Anexo 5. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la región granular del giro dentado del hipocampo luego de una ischemia cerebral focal.



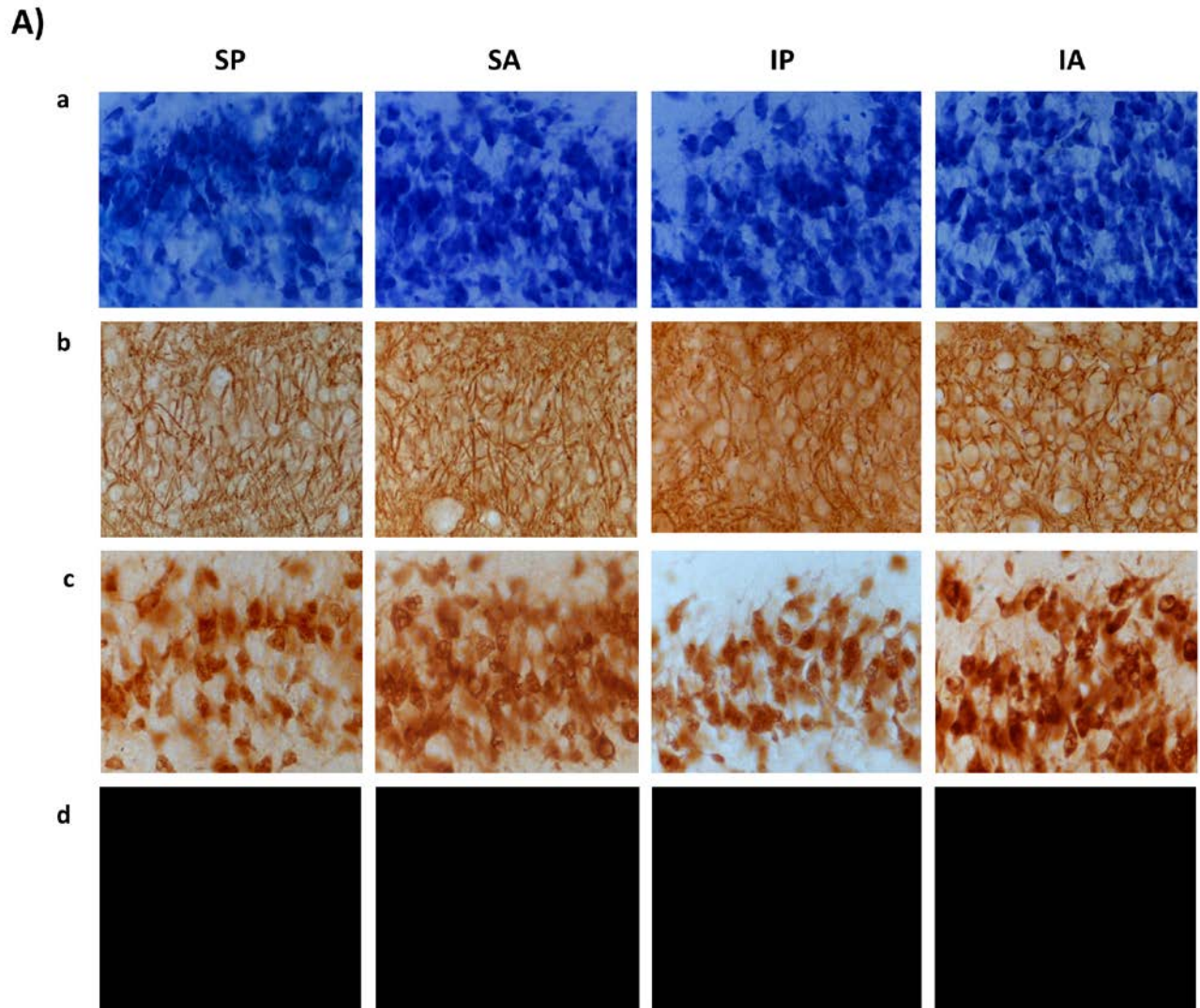
A) Imágenes representativas de la región granular del giro dentado para el brema (-3.60). Tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA.

Anexo 6. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para la región subgranular del giro dentado del hipocampo luego de una ischemia cerebral focal.



A) Imágenes representativas de la región subgranular del giro dentado para el brema (-3.60). Tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluorojade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA.

Anexo 7. Efecto a 12 días post-isquemia de la atorvastatina para el hillux del giro dentado del hipocampo luego de una isquemia cerebral focal.



A) Imágenes representativas de la región subgranular del giro dentado para el brema (-3.60). Tinción de a) Nissl, b) MAP-2, c) NeuN y d) Fluor Jade para los cuatro tratamientos SP, SA, IP, IA.

Anexo 8. Lista de datos para los animales excluidos del experimento

Datos del laberinto acuático de Morris									
Aprendizaje									Retención
Nombre del Animal	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Ensayo 7	Ensayo 8	
SP3	70,25 s	39,25 s	20,25 s	35,75 s	38,5 s	19 s	32 s	16,25 s	60 s
SA1	78,75 s	33,75	9,75 s	5,5 s	7 s	6 s	5,25 s	5,25 s	60 s
G2IP3	72 s	70, 25 s	42 s	16,25 s	13,5 s	6,5 s	8, 75 s	8,5 s	9 s
IA5	57,5 s	43, 5 s	29 s	52, 2 s	15 s	42 s	26,75 s	11, 75 s	52 s

Nomenclatura:

- **SP3:** SHAM-PLACEBO No. 3
- **SA1:** SHAM-ATORVASTATINA No. 1
- **GSIP3:** ISQUEMIA-ATORVASTATINA No. 3 del grupo 2
- **IA5:** ISQUEMIA-ATORVASTATINA No. 5