



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**Facultad De Ciencias Químicas
Licenciatura Químico Farmacobiólogo
Departamento de Análisis Clínicos**

Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas (LIQC)

**“Óxido nítrico influye en el Aprendizaje y la Memoria tras un
proceso Hipóxico-Isquémico cerebral en rata”**

Tesis para obtener el Título de Químico Farmacobiólogo

Presenta

pQ.F.B Alejandro González Vázquez

**Directora de tesis
D. C. Bertha Alicia León Chávez
Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas (LIQC)**

PUEBLA, PUE. JULIO 2015

Dedicatoria

A mi tío Gumerindo Hernández Vázquez (en paz descanse). Le debo parte de mi formación humana e incondicional apoyo en momentos difíciles. Me quedo con todo lo que me ensañaste y lo que compartimos. Con gran cariño.

A mis hermanos. Christian Fernando González Vázquez (mi igual) y Francisco Javier González Vázquez (mi contraparte). Ambos son personas importantes en mi vida y debo guiar en la vida.

A mi padre (mi alma). Luis Francisco González Vázquez (en paz descanse). Señor de carácter fuerte, duro, inquebrantable e insobornable. Mi mentor en la vida, quien contribuyo a no conformarme, quien me enseñó que en la vida hay que trabajar duro para tener lo que quieres, quien con sus regaños me enseñó a no rendirme, a pelear por tus ideas (por mas necio que parezcas), su disciplina formo mi personalidad y carácter, quien me moldeó para bien y a no temer. Te debo quien soy en este momento. Y aunque no estés, pienso que seguirás muy lejos o muy cerca a mi lado apoyándome en cada paso en la vida. También es tu logro. Con mucho amor y dedicación.

Y en especial a mi madre (mi corazón y mi fuerza). Gema Vázquez Pérez. Señora de corazón noble, sensible y fuerte. Mi principal maestra en la vida, quien incondicionalmente me apoyo en cada aspecto de mi vida, quien con sus preocupaciones, esfuerzo y desvelos ve el hoy una meta alcanzada. Madre mía, celebra hoy, porque todo lo que hiciste abrió paso a lo que decidí hacer. Mis logros son tuyos. Con gran amor y afecto para ti.

Agradecimientos

Al igual que una casa se construye con base en buenos cimientos, una persona debe ser construir una mentalidad positiva y con criterio muchas personas han y son parte importante en mi formación académica, humana y social. Tengo mucho que agradecer a todas y cada una de ellas y con mucho cariño mostrarles lo que he logrado:

A mi director, la D.C. Bertha Alicia León Chávez. Por su atención, apoyo y dedicación demostrados a lo largo de mi estancia. Su serenidad y paciencia en el trabajo son virtudes que me ayudan hoy a formarme como el investigador que quiero ser. Con gran aprecio y cariño.

A mi asesor, la M.C. Araceli Ugarte Rojano. Por su apoyo e interés a lo largo de la redacción de este trabajo, además de sus aportaciones en los momentos que le solicite.

A mi comisión revisora. El M.C. Gonzalo Garzón García, profesor que mostró disponibilidad para poder revisar y aprobar este trabajo. Al D.C. Victorino G.S. Alatraste Bueno, profesor que me mostro que uno tiene la capacidad de adaptarse a las circunstancias que se nos presente. Y el D.C. Eduardo Miguel Brambila Colombres, profesor e investigador, gran persona que muestra enorme dedicación en la investigación, dedicación que se contagia.

A los profesores que ayudaron a mi formación académica. M.C. Eduardo Villegas, M.C. Maricela Torres y Soto, M.C. José Ángel Flores Hernández, M.C. Samuel Treviño Mora, D.C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca, M.C. Eduardo Velázquez Sánchez, D.C. Victorino G. S. Alatraste Bueno M.C. Celia Piña Leyva, D.C. Alejandra Tovar y D.C. Eduardo Miguel Brambila Colombres. Cada uno de ellos me enseñó de una forma distinta a poner todo mi empeño para lograr un objetivo, muchas gracias por hacer que me interesara por asistir a sus clases.

Al D.C. Daniel Martínez-Fong. Que sin tener una relación directa, pero si un vínculo profesional, ayudó para poder llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

Al D.C. Juan Antonio González Barrios. Por permitirme realizar prácticas profesionales en su laboratorio en el Hospital 1ro de Octubre en la Ciudad de México. Una pequeña estancia muy productiva.

Al D.C. I. Daniel Limón Pérez de León. Por recibirnos con sus palabras de ánimo todos los días de evaluación en su laboratorio para usar el Laberinto Acuático de Morris... Bueno para las ratas, no para nosotros.

A la D.C. Guadalupe Soto Rodríguez la M.C. Celia Piña Leyva y al M.C. Víctor Manuel Blanco Álvarez. Por sus aportaciones y críticas a la realización y presentación de los trabajos que tuve la oportunidad de exponer en diferentes eventos.

A mis amigos. M.C.P Saúl Guzmán Herrera, I. Jesús Cortes Hernández, Q.F.B. Ana Silvia Hernández Flores, Q.F.B. Víctor Gabriel Canuas Landero, pQ.F.B. Uriel Rodríguez Álvarez, pQ.F.B. Oscar Alejandro Hernández Perez, I.Q. Luis Fernando Espino Rodríguez, Q.F.B. Angélica Luna Mora, Químico Elfego Eduardo Vivanco Dávila, Q.F.B. Verónica Toxqui Xiqui, Q.F.B. Omar Cano Jiménez, Q.F.B. Omar Enrique Ahuatzin Flores, Q.F.B. Jesús Medina Carrera y Q.F.B. Ana Karina Aguilar Peralta. A todos y cada uno de ustedes les agradezco por compartir más que un gusto o punto de vista, por compartir parte importante de mi vida, no importa el punto de encuentro en el tiempo en nuestras vidas. Son personas que me ayudaron a hacer más corta una carrera de 5 años.

A mis compañeros de laboratorio. pQ.F.B. Wendy García Falfán, pQ.F.B. Guadalupe Rivera Torruco, pQ.F.B. Omar Enrique Ahuatzin Flores, pQ.F.B. Verónica Toxqui Xiqui, Q.F.B. Jesús Medina Carrera y Q.F.B. Ana Karina Aguilar Peralta. A ustedes les agradezco momentos de ocurrencia que me hacían distraerme y despejarme del trabajo en el laboratorio, las tardes de plática, su asistencia a seminarios y sus puntos de vista en los trabajos que les pude exponer.

A la Q.F.B. Ana Karina Aguilar Peralta. Una persona con una personalidad incomparable, de gran espíritu y un ánimo que contagia felicidad. Agradezco su amistad y cariño. Podría decir que sin ella este trabajo no estaría en mis manos. Una mujer que me brinda apoyo incondicional. Gracias por seguir a mi lado.

A mis padrinos. A la Sra. Ángela Vázquez Perez y Sr. Juan Domínguez Evaristo, Sr. Juan Vázquez Perez, el M.C.P. Fernando Amigón Azcarraga y la M.C.P. María Leticia Verónica Cid Paz, el I. Q. Domingo Flores Motolina y la Enfermera Irene Tlacuáhuac Juárez. Por el interés hacia mi persona desde que las conozco, por apoyarme y darme buen consejo para seguir en el camino en el que estoy. Con gran afecto y cariño para ustedes.

A mi familia (y es “pequeña”). Mis primos, María de Jesús Hernández, Armando Hernández Vázquez, Marco Antonio Luna Vázquez. Mis tíos, Hortencia Vázquez Perez, Pablo Vázquez Perez, Ángela Vázquez Perez, y Juan Domínguez Evaristo, Juan Vázquez Perez, Marcelo Vázquez Perez, Pedro Vázquez Perez y Felicitas Vázquez Perez (mi tercera madre). Mis abuelos, Juan Vázquez Hernández y Sara Pérez Hernández. Les debo su apoyo, consejo, regaños, felicitaciones y compañía en la vida. Este triunfo también es de ustedes.

Índice

Abreviaturas	i
Resumen	iv
1. Bases moleculares del Aprendizaje y la Memoria en la Potenciación a Largo plazo	1
2. Estructuras cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria	1
3. La inflamación influye en el Aprendizaje y la Memoria	2
4. Relación de los Accidentes cerebrovasculares y la demencia	4
5. Infarto	4
6. Respuesta fisiológica de los vasos sanguíneos ante un infarto isquémico	5
7. Epidemiología de los Accidentes Cerebrovasculares	6
a) Accidente cerebrovascular isquémico u oclusivo	6
b) Accidente cerebrovascular de tipo hemorrágico	7
8. Accidente Cerebrovascular transitorio	7
9. Accidente Cerebrovascular recurrente	8
10. Activación de la cascada isquémica ante un infarto cerebral	9
11. Sintetasas del Óxido Nítrico (NOS)	11
12. Óxido Nítrico (NO)	14
12.1 Funciones del Óxido Nítrico en el cerebro	14
12.2 Función del óxido nítrico en el aprendizaje	15
12.3 El óxido nítrico en condiciones isquémicas	18
13. Lipoperoxidación en Hipoxia-Isquemia	21
14. Zinc en la Hipoxia-Isquemia	22
Justificación	24
Hipótesis	24
Objetivo General	25
Objetivos particulares	25
Diagrama de flujo	26
Materiales	27
Animales experimentales	27

Animales de experimentación	27
Administración de L- ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)	27
Entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris para evaluar el aprendizaje y la memoria en roedores	27
Metodología	29
Protocolo de la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP)	29
Obtención de cerebros	29
Procesamiento de las muestras	29
Evaluación bioquímica	30
1.- Cuantificación de los niveles de Proteínas totales (Sedmak et al., 1977)	30
2.- Cuantificación de los niveles de Malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) (Gerard-Monnier et al., 1998)	30
3.- Cuantificación de los niveles de nitritos (Chao et al., 1992)	31
4.- Cuantificación de los niveles de Zinc (Johnson et al., 1977)	32
Resultados	33
Discusión de Resultados	39
Conclusión	44
Bibliografía	45
Anexos	52
Técnica para la cuantificación de proteínas totales por el método de Commassie	52
Reactivo de Commassie	52
Técnica para la cuantificación de Nitritos por el método de Griess	52
Técnica para determinar MDA y 4-HDA por el método de Gerard-Monnier	54
Técnica para determinar Zinc por el método de Jonhson	55

Índice de figuras

	Página
<i>Figura 1. Descripción del circuito trisináptico</i>	2
<i>Figura 2. Clasificación de los Accidentes Cerebrovasculares</i>	8
<i>Figura 3. Mecanismo postulado para explicar la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad en isquemia cerebral</i>	11
<i>Figura 4. Representación del funcionamiento y estructura de la Sintasa del Óxido Nítrico</i>	13
<i>Figura 5. Vías de señalización involucradas en la promoción de la neurogénesis y plasticidad sináptica para desarrollar la potenciación a largo plazo</i>	17
<i>Figura 6. La lipoperoxidación desencadena diversos mecanismos que potencializan el daño celular, la reacción Fenton y no Fenton promueven el Estrés Oxidativo llevando a la muerte celular</i>	20
<i>Figura 7. Laberinto Acuático de Morris</i>	28
<i>Figura 8. Efecto de la Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva sobre el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y analitos cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria</i>	33
<i>Figura 9. Efecto del NO sobre el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y analitos cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria</i>	34
<i>Figura 10. Efecto de la administración de L-NAME previo a la Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva sobre el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y analitos cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria</i>	36
<i>Figura 11. Efecto de la administración de L-NAME sobre la Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva y el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y analitos cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria</i>	37

Abreviaturas

ACV Accidente Cerebrovascular

AGL Ácidos Grasos Libres

AMPA Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (receptor de membrana)

AC Adenilato Ciclasa

cAMP Monofosfato de Adenosina cíclico

ATP Trifosfato de Adenina

BDNF Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (por sus siglas en ingles BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor)

BH₄ Tetrahidrobiopterina (5,6,7,8-tetrahidrobiopterina)

Ca⁺² Calcio iónico

[Ca⁺²]_i Calcio intracelular

CcOx Citocromo c Oxidasa

Ca⁺²/CaM Complejo Calcio/Calmodulina

°C Grados Celsius (Temperatura)

CREB Elemento de Respuesta al cAMP

CA1 Cuerno de Ammonis 1 (Región del hipocampo)

CA3 Cuerno de Ammonis 3 (Región del hipocampo)

EDRF Factor Relajante Derivado del Endotelio (por sus siglas en ingles EDRF, Endotelial Derived Relax Factor)

e⁻ Electrón

ERK Cinasa Reguladora de señales Extracelulares (por sus siglas en ingles ERK, Extracellular signal-Regulated Kinase)

eNOS Sintasa del Óxido Nítrico Endotelial (por sus siglas en ingles eNOS, endotelial Nitric Oxide Synthase)

DNA Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en ingles DNA, Desoxirribonucleotic Acid)

FAD Flavin Adenin Dinucleótido

Fe Hierro

FMN Flavin Mononucleótido

FSC Flujo Sanguíneo Cerebral
GD Giro Dentado
Glu Glutamato
GC Guanilato Ciclasa
sGC Guanilato Ciclasa soluble
cGMP Monofosfato de Guanina cíclico
4-HDA 4-Hidroxidialquenos
h Hora (unidad de tiempo)
H₂O Agua
IL Interleucina
IGF Factor de Crecimiento semejante a la Insulina (por sus siglas en ingles IGF, Insulin-like Growth Factor)
iNOS Sintasa del Óxido Nítrico Inducible (por sus siglas en ingles eNOS, Inducible Nitric Oxide Synthase)
i.p. Intraperitoneal (vía de administración)
kg kilogramo (unidad de peso)
L-Arg L-Arginina (aminoácido)
LPO Lipoperoxidación
LTP Potenciación a largo plazo (por sus siglas en ingles LTP, Long Term-Potentiation)
MDA Malonildialdehído
MAPK Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (por sus siglas en ingles MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase)
μmol Micromol (concentración)
M Molar (unidad de concentración)
Na⁺ Sodio iónico
Na-K-ATPasa Bomba Sodio-Potasio ATPasa
NADPH⁺ Dinucleótido de Nicotinamida Adenin Fosfato reducido
NF-κB Factor Nuclear κ inducida por células B
NFG Factor de Crecimiento Neural (por sus siglas en ingles NGF, Neural Growth Factor)
NHA N-ω-hidroxiarginina

nM Nanomolar (unidad de concentración)

NMDA N-Metil-D-Aspartato (receptor de membrana)

nNOS Sintasa del Óxido Nítrico Neuronal (por sus siglas en ingles nNOS, Neuronal Nitric Oxide Synthase)

NO Óxido Nítrico (por sus siglas en ingles NO, Nitric Oxide)

NO_2^- Nitritos

NO_3^- Nitratos

NOS Sintasa del Óxido Nítrico (por sus siglas en ingles NOS, Nitric Oxide Synthase)

O₂ Oxígeno molecular

O₂⁻ Anión superóxido

·O₂H Radical Peroxil

·OH Radical Hidroxil

ONOO⁻ Peroxinitrito

OACP Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva

PKA Proteína Cinasa dependiente de cAMP

PKG Proteína Cinasa dependiente de cGMP

PL Fosfolipasa

RNS Especies Reactivas de Nitrógeno (por sus siglas en ingles RNS, Reactive Nitrogen Species)

ROS Especies Reactivas de Oxígeno (por sus siglas en ingles ROS, Reactive Oxygen Species)

s Segundos (unidad de tiempo)

SNC Sistema Nervioso Central

SOD Superóxido Dismutasa

TNF- α Factor de Necrosis Tumoral α (por sus siglas en ingles TNF- α , Tumoral Necrosis Factor)

Zn Zinc

Zn²⁺ Zinc iónico

Resumen

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) representan un grave problema de salud pública a nivel mundial. Las características de la fisiopatología de los ACV's son la disminución de oxígeno y nutrientes al tejido cerebral afectado, depende de del tiempo de duración de la obstrucción sanguínea, lo cual puede reflejar el daño causado. Diversas moléculas han sido involucradas en el daño isquémico, dentro de estas, el óxido nítrico participa durante las etapas del daño post-isquémico.

El Óxido Nítrico participa de igual manera en la amplificación del aprendizaje y memoria así como en la exacerbación del daño provocado por un infarto cerebral, la diferencia radica en las concentraciones que se producen en ambos casos. En condiciones patológicas tal como sucede en los ACV's, el óxido nítrico potencializa mecanismos inflamatorios y neurotóxicos que tienen como fin el daño celular y la muerte neuronal. Las investigaciones en el tratamiento del infarto isquémico con el uso de inhibidores inespecíficos de la Sintasa del Óxido Nítrico (NOS) como el L- ω -Nitro-Metil-Arginina Ester (L-NAME) se enfocan en disminuir el daño celular provocado por la sobre-estimulación de las Sintetas del Óxido Nítrico tras un episodio isquémico manteniendo funciones cerebrales esenciales que dan soporte a la conducta de los sujetos de experimentación, disminuyendo así la neurodegeneración y producción de sustancias citotóxicas (Malonildialdehído, 4-Hidroxi-alquenos, Nitritos) en la zona cerebral afectada.

Para llevar a cabo este trabajo se evaluó un modelo de obstrucción y daño cerebral, la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) en un modelo de experimentación (rata). Los grupos control fueron 1) Control sin tratamiento, 2) Control, 3) Isquemia, 4) L-NAME (10mg/kg, vía i.p.) y 5) L-NAME + Isquemia (10 mg/kg vía i.p. 1h antes de la OACP) cada grupo fue subdividido en Aprendizaje y Aprendizaje-Memoria. La evaluación de Aprendizaje y Memoria se llevó a cabo en el Laberinto Acuático de Morris (LAM) que consta de 4 ensayos por día durante 5 días consecutivos y la memoria fue evaluada 7 días después del último día de aprendizaje. En ambas evaluaciones de Aprendizaje se registró la latencia de escape (tiempo que tarda la rata en localizar la plataforma de escape localizada en la zona sureste del Laberinto Acuático de Morris) y en la evaluación de la memoria se retiró la torre de escape de la piscina y se registró el número de visitas en la zona sureste del Laberinto Acuático y la latencia para localizar dicha zona. Todos los animales de experimentación fueron sacrificados al final de las evaluaciones para obtener el cerebro y disectar la corteza temporo-parietal izquierda para determinar Malonildialdehído y 4-Hidroxi-alquenos, Zinc, Nitritos y Proteínas Totales.

Las evaluaciones en el LAM muestran que el NO está involucrado en el aprendizaje y la memoria (Grupo L-NAME vs Control), la isquemia no perjudica el aprendizaje pero si modificó la recuperación de la información (Isquemia vs Control) y el tratamiento con L-NAME ante la OACP por 10min, no altera significativamente el aprendizaje y recupera la función de memoria alterada por la Isquemia (Isquemia vs L-NAME Isquemia)

Los resultados muestran un aumento en los valores del MDA y 4-HDA en los grupos Problema respecto al grupo Control ($p < 0.05$) tras la evaluación de Aprendizaje (4 ensayos por día, 5 días consecutivos) y Memoria (un ensayo 7 días después del último ensayo de Aprendizaje). Los valores de Nitritos mostraron una disminución en los grupos tratados con L-NAME, tanto para los grupos Aprendizaje y Memoria, respecto al grupo control ($p < 0.05$). Mientras que los valores de Zinc no muestran cambios significativos entre grupos respecto al grupo Control Ap, pero sí una tendencia a disminuir en los grupos Aprendizaje, y variaciones en los grupos Memoria.

Estos resultados podrían la participación del Óxido Nítrico en el desarrollo del aprendizaje y la memoria, la isquemia cerebral no afecta el aprendizaje, pero sí la memoria. El tratamiento previo con L-NAME disminuye el estrés nitrosativo que se presenta en condiciones isquémicas a pesar del incremento de los niveles de MDA y 4-HDA y no repercute en el rendimiento de las ratas en el Laberinto Acuático para desarrollar aprendizaje y memoria.

1. Bases moleculares del Aprendizaje y la Memoria en la Potenciación al Largo plazo

El aprendizaje es una manifestación de supervivencia que expresan los individuos como respuesta a un ambiente con estímulos continuos generados por el medio ambiente para su desarrollo **(White, 2008)**. Mientras tanto la memoria constituye la retención y almacenamiento de la información adquirida durante el proceso de aprendizaje **(Carrillo-Mora et al., 2009)**.

La vías neuronales del aprendizaje y la memoria dependen de la activación de los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) **(Giese & Mizumo, 2013)**. Las principales terminales glutamatérgicas se encuentran en el Giro Dentado (GD) del Hipocampo **(Doze & Perez, 2012)**. El hipocampo y la corteza temporal, son estructuras cerebrales implicadas en el correcto desarrollo del aprendizaje y la memoria. Estudios *in vivo* muestran que lesiones en el hipocampo y en la corteza temporal pueden afectar estos procesos **(Kandel, 2000; Morris et al., 1982)**.

2. Estructuras cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria

El cerebro cuenta con distintas estructuras que mantienen y desarrollan procesos aprendizaje y memoria, tal es el caso de la amígdala **(Akirav & Maroun, 2007)** la corteza cerebral y el hipocampo **(Carrillo-Mora et al., 2009; Morris et al., 1982)**. Cada estructura está relacionada con un tipo de aprendizaje y memoria diferente, por ejemplo, en la amígdala se desarrolla aprendizaje y memoria condicionada por aversión **(Waltreit & Weller, 2003; Abel & Nguyen, 2008)**; en la corteza cerebral se puede desarrollar el aprendizaje inducido por miedo y navegación espacial **(Akirav y Maroun, 2007)** y en el hipocampo se desarrolla el aprendizaje y memoria espacial **(Carrillo-Mora et al., 2009; Morris et al., 1982; Morris, 1984; Vicens et al., 2003)**.

El hipocampo funciona a partir del principal neurotransmisor excitatorio, el glutamato. El circuito hipocampal también conocido como circuito trisináptico consta de

zonas (CA1, CA3 y Giro Dentado) que se intercomunican para poder llevar a cabo la plasticidad en el hipocampo, adicionalmente este recibe información de regiones corticales y subcorticales al Giro Dentado (DG), la información es transportada a la región CA3, a través de la vía colateral de Schaffer, la información es transportada a la región CA1, en donde el estímulo es capaz de promover la sinapsis hacia las regiones corticales y subcorticales (**Swcatt, 2003**), (ver figura 1).

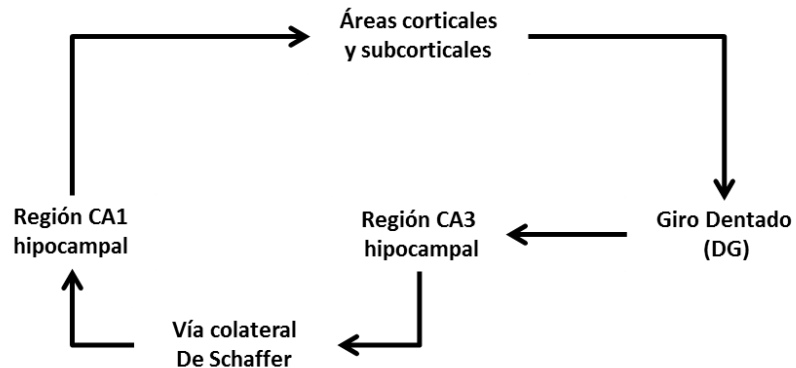


Figura 1. Descripción del circuito trisináptico. Las regiones del hipocampo tienen una gran relación con la memoria espacial en ratas. Las interconexiones entre zonas permiten el correcto funcionamiento del circuito trisináptico (tomado de **Swcatt, 2003**).

3. La inflamación influye en el Aprendizaje y la Memoria

Los procesos de neurogénesis se ven influenciados de manera positiva en ambientes enriquecidos o con factores que la promueven, tal es el caso del ejercicio, en donde la microglia interviene en la proliferación celular promoviendo la neurogénesis y plasticidad sináptica. Por otra parte existen factores que disminuyen o afectan la neurogénesis, por ejemplo: el envejecimiento y procesos inflamatorios. Las citocinas pro-inflamatorias que son producidas durante un daño celular promueven un ambiente tóxico para las células que no han sido dañadas, sin embargo moléculas como los factores de crecimiento propician un ambiente apropiado a neuronas. En otras palabras existe una relación inversa entre factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias y por la tanto en el Aprendizaje-Inflamación (**Kohman & Rhodes, 2013**).

Ha sido mostrado que la inflamación afecta etapas de la formación de la memoria dañando la adquisición o alterando la consolidación y recuperación de la información. Actualmente, los mecanismos a través de los cuáles la inflamación daña las áreas cerebrales implicadas en la función cognitiva permanecen desconocidos. Sin embargo, diversos procesos que ya se conocen juegan un papel en el aprendizaje y la memoria dañados después de la activación del sistema inmune. Por ejemplo, evidencias indican que la inflamación puede alterar procesos cognitivos a través de la Potenciación a Largo Plazo (por sus siglas en inglés LTP, Long-Term Potentiation), uno de los más amplios mecanismos de reorganización celular para el aprendizaje y la memoria. Un mecanismo adicional a través del cual la inflamación podría interrumpir funciones cognitivas es alterando de los niveles de factores tróficos a nivel cerebral como el Factor de Neurotrófico Derivado del Cerebro (por sus siglas en inglés BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor), Factor de Crecimiento Nervioso (por sus siglas en inglés NGF, Nerve Growth Factor) y el Factor de Crecimiento semejante a la Insulina (por sus siglas en inglés IGF, Insulin-like Growth Factor) los cuales están críticamente relacionados con el sustento de la formación de la memoria, la neurogénesis y LTP **(Kohman & Rhodes, 2013)**.

La inflamación también está asociada con una reducción de la activación neuronal inducida por eventos nerviosos normales medidos a través de la expresión inmediata de genes tempranos como *Arc*, indicando que la neuro-inflamación interfiere la función cerebral para el aprendizaje por experiencia cuando se compara contra encéfalos saludables. La inflamación disminuye la neurogénesis, por lo que ha sido correlacionada con el bajo rendimiento en diversas tareas de comportamiento que muestran un déficit posterior a la activación inmune. Esta información potencialmente indica que la inflamación induce un déficit en el rendimiento cognitivo que podría estar relacionado a la reducción en la neurogénesis, particularmente cuando la respuesta inflamatoria persiste por periodos de tiempo largo **(Kohman & Rhodes, 2013)**.

Estudios clínicos muestran una relación entre la velocidad de sedimentación globular y el deterioro cognitivo post-infarto que se presenta particularmente en un test de memoria y una reducción del volumen hipocampal en pacientes que han sobrevivido a un infarto cerebral, además, marcadores inflamatorios pueden estar interviniendo

negativamente por diferentes vías (que aún no están claras) en el declive cognitivo **(Kliper et al., 2013)**.

4. Relación de los Accidentes cerebrovasculares y la demencia

El infarto cerebral puede ocasionar demencia por tres diferentes mecanismos:

- a) Los infartos pueden tener una ubicación crítica. La lesión del tálamo o del área temporal puede producir amnesia; la lesión de la arteria cerebral media puede dar origen a trastornos cognitivos, alteración del lenguaje o la discriminación espacial; la lesión del lóbulo frontal (arteria cerebral anterior) puede originar trastornos de memoria.
- b) En los infartos múltiples dispersos, uno solo no es suficiente para producir un deterioro cognitivo importante, pero la influencia de estos aumenta el volumen de daño cerebral hasta en 100 cm³.
- c) Los vasos sanguíneos de bajo calibre afectados en el infarto afectan sobre todo a la sustancia blanca cerebral profunda produciendo lagunas mentales dispersas o lesiones isquémicas más profundas **(Kandel, 2000)**.

5. Infarto

La definición de infarto hace referencia a la porción de parénquima privada súbitamente de circulación sanguínea por la obstrucción de vasos arteriales o venosos y el conjunto de fenómenos patológicos consecutivos a esta obstrucción **(Diccionario Médico)**.

Los infartos localizados en el territorio de la arteria cerebral media (corteza y sustancia blanca) causan el síndrome de ictus (ataque súbito), debilidad contralateral, hipoestesia y alteración del campo visual (hemianopsia homónima) y según el hemisferio afectado hay presencia de trastornos en el lenguaje y la percepción espacial **(Kandel, 2000)**.

6. Respuesta fisiológica de los vasos sanguíneos ante un infarto isquémico

El cerebro recibe el 20% del flujo total de sangre, independientemente de cualquier evento que pueda suscitarse. La presión arterial del flujo sanguíneo cerebral debe descender 60mmHg y mantener una autorregulación. El flujo sanguíneo cerebral (FSC) es de 50 mL/100 g de tejido/min, este FSC está acoplado al metabolismo neuronal. En una condición patológica como lo es la isquemia el FSC desciende a 10-20 mL/100g de tejido/min provocando una caída en la actividad neuronal conduciendo a la muerte neuronal por necrosis y apoptosis (**Kandel, 2000; Powers y Zazulia, 2011**).

Los vasos cerebrales pueden modificar su calibre para responder de un modo específico a los requerimientos fisiológicos alterados. Existen dos tipos de mecanismos de autorregulación ante una alteración en la homeostasis cerebral. 1.- Cuando la presión arterial sistémica se eleva, debe ser compensada con la vasoconstricción de las arteriolas cerebrales, mientras que cuando la presión arterial disminuye las arteriolas se dilatan. Estos ajustes ayudan a mantener el flujo sanguíneo cerebral adecuado. 2.- La autorregulación hace participes a las concentraciones de gases en sangre y tejidos así como el pH. Cuando la concentración de CO₂ aumenta en las arterias, las arteriolas se dilatan y se incrementa el flujo sanguíneo cerebral (**Kandel, 2000; Markus, 2004**). Ambos mecanismos de autorregulación protegen al cerebro aumentando el aporte de oxígeno y la eliminación de metabolitos ácidos en caso de hipoxia-isquemia o lesión tisular. La isquemia no es sinónimo de anoxia, la definición de isquemia es la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo de una parte del cuerpo, producida por una alteración normal o patológica de la arteria o arterias aferentes a ella, con esto la disminución del aporte de sangre al tejido privando no solo de oxígeno sino también de nutrientes. De la misma manera la isquemia impide la eliminación de metabolitos tóxicos como ácido láctico, especies reactivas de oxígeno (ROS), Malonildialdehído (MDA), etc. acumulándose y produciendo daño celular (**Kandel, 2000**).

7. Epidemiología de los Accidentes Cerebrovasculares

Los accidentes cerebrovasculares (ACV's) son la tercera causa de muerte a nivel mundial y la primera causa de incapacidad motora en la población socioeconómicamente activa (**OMS, 2014; Pandya et al., 2011**). Datos reportados indican que los ACV's son la primera causa de discapacidad y la segunda causa de demencia en pacientes adultos (**Lozano & Soliz, 2007; Ruíz-Sandoval et al., 2012**).

Los ACV's son definidos como un grupo heterogéneo de trastornos que modifican de manera súbita la irrigación sanguínea al cerebro, sus principales signos y síntomas neurológicos se manifiestan rápidamente alterando la función cerebral. La principal característica de los ACV's de tipo isquémico es la obstrucción de uno o varios vasos sanguíneos que irrigan al cerebro, este proceso de oclusión se denomina isquemia (**Ruíz-Sandoval et al., 2012**).

Los ACV's manifiestan un conjunto de signos y síntomas (síndrome hipóxico-isquémico) muy similares a los de la patología cardiovascular que podrían tener graves consecuencias en la integridad de los pacientes que no son tratados y/o diagnosticados de manera oportuna. Aproximadamente un 80% de todos los accidentes cerebrovasculares son de tipo isquémico (**NIH, 2000**) y se estima que el riesgo a la vida por un infarto cerebral está entre el 8% al 10% (**Woodruff et al., 2011**).

Para estudiar la fisiopatología de los accidentes vasculares cerebrales, estos se han dividido en dos grandes grupos: isquémicos y hemorrágicos.

a) Accidente cerebrovascular isquémico u oclusivo

También llamado infarto cerebral sucede cuando una arteria que suministra sangre al cerebro está bloqueada, lo que reduce repentinamente el flujo de sangre causando un infarto cerebral. Los coágulos y émbolos son la causa más común del bloqueo arterial (**NIH, 2000**).

Origen trombótico: los coágulos son la causa más común del bloqueo arterial en el infarto cerebral. En condiciones patológicas la coagulación se encuentra descompensada por diversos factores, lo que propicia un mal funcionamiento en la fase fluida de la coagulación, reparación y protección en el endotelio (**NIH, 2000**).

Origen embólico: los coágulos pueden desprenderse del endotelio y convertirse en émbolos, estos tienen libre acceso a cualquier parte del cuerpo hasta llegar a un vaso cerebral de menor calibre en donde pueden quedar atrapados causando obstrucción al flujo sanguíneo y generando un infarto cerebral **(NIH, 2000)**.

b) Accidente cerebrovascular de tipo hemorrágico

Es causado por la ruptura de un vaso sanguíneo a nivel cerebral lo que produce una hemorragia, consecuentemente se presenta neuro-hematotoxicidad. Hay un aumento en el volumen del líquido intersticial provocando hidrocefalia y aumento de la presión intracerebral haciendo que la masa encefálica sea susceptible a otro infarto. Las hemorragias intracerebrales tienen mortalidad del 30 a 50% en fase aguda, la hemorragia subaracnoidea de 20-30%, el infarto cerebral 15-30% y la trombosis venosa cerebral de 8-15%. Las secuelas son mayores en las formas hemorrágicas del AVC **(Ruíz-Sandoval et al., 2012; NIH, 2000)**.

- I. Hemorragia intracerebral: este subtipo de ACV puede ser causado por hipertensión arterial, malformaciones vasculares a nivel cerebral, angiopatía amiloidea, coagulopatías y el uso crónico de drogas que alteran la función del sistema vascular cerebral **(NIH, 2000)**.
- II. Hemorragia subaracnoidea: este subtipo de ACV es por causa aneurismática o no aneurismática **(NIH, 2000)**.

Si bien es importante conocer el origen del ACV, de la misma manera también es importante definir el tiempo de duración del accidente vascular, con base en esto el AVC se divide en transitorio y recurrente **(NIH, 2000)**.

8. Accidente Cerebrovascular transitorio

También llamado "mini-accidente cerebrovascular" (TIA, por sus siglas en inglés Transitori Ischemic Accident), comienza exactamente como un accidente vascular cerebral pero luego se resuelve sin dejar síntomas o repercusiones notables. La aparición de un ataque isquémico transitorio es una advertencia de que el paciente presenta riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular más grave. La adición de otros

factores aumenta el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular recurrente. La duración promedio de un ataque isquémico transitorio es de minutos. En casi todos los ataques isquémicos transitorios, los síntomas desaparecen en una hora (NIH, 2000).

9. Accidente Cerebrovascular recurrente

Este tipo de accidentes cerebrovasculares son más frecuentes y representan un importante elemento que contribuye a la discapacidad y a la muerte por accidente vascular cerebral. Conforme el número de ACV's aumenta en un paciente, también aumenta el riesgo de sufrir incapacidad psicomotora o hasta la muerte (NIH, 2000).

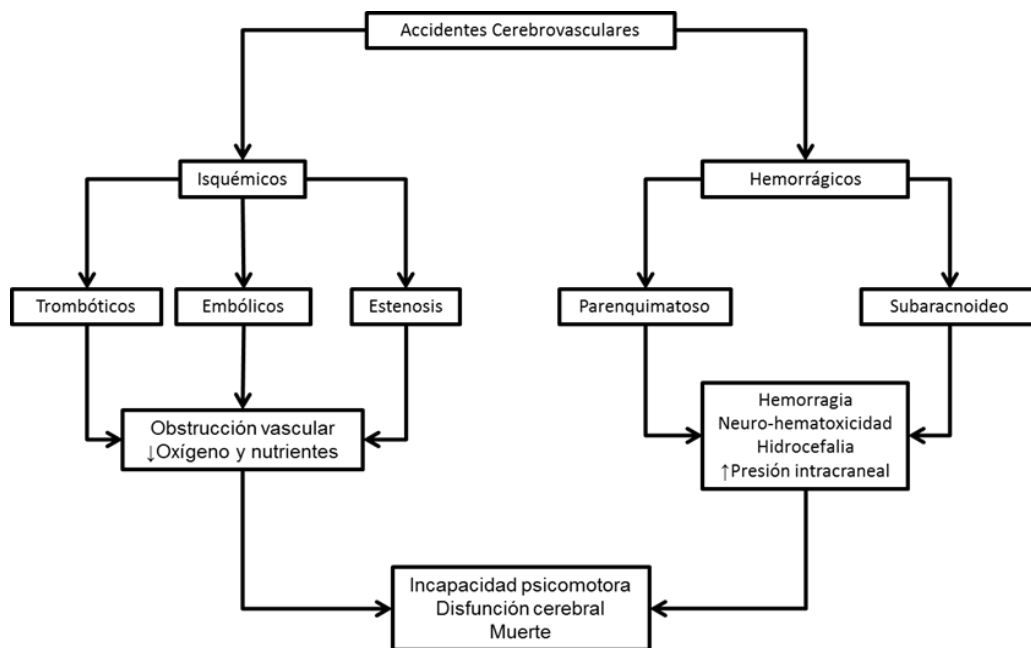


Figura 2. Clasificación de los Accidentes Cerebrovasculares. Clasificación en base a la fisiopatología de los Accidentes Cerebrovasculares (ACV's), diferencias entre ambos grupos y consecuencias que estos provocan (tomado de Ruiz-Sandoval et al, 2012).

10. Activación de la cascada isquémica ante un infarto cerebral

La reducción del flujo sanguíneo cerebral inicia la cascada isquémica, conduciendo al desarrollo de la penumbra isquémica circundante y un área irreversible de infarto (núcleo de infarto). A nivel celular, la reducción del flujo sanguíneo resulta en una falla de la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa, produciendo una interrupción en la producción de ATP (Adenosin Trifosfato) y un fallo en las bombas Na-K-ATPasa que conducen a un incremento del sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) intracelulares provocado por una despolarización de la membrana celular. El resultado de la despolarización de la membrana conduce a la liberación excesiva de neurotransmisores excitadores como el glutamato, causando una excitotoxicidad lo que lleva a activar la cascada isquémica (**Pandya et al., 2011**). La cascada isquémica es el conjunto de fenómenos patológicos que se llevan a cabo cuando un infarto cerebral está en marcha. La privación del oxígeno y nutrientes provoca una disminución en el pH (acidosis láctica) que modifica la integridad de las proteínas de membrana en la neurona, el estímulo nocivo de la obstrucción sanguínea sobre-estimula la liberación de glutamato a la sinapsis, el glutamato se une a sus receptores en la neurona post-sináptica NMDA y AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), lo que aumenta el flujo de Ca^{2+} y Na^+ respectivamente al interior de la neurona, favoreciendo un desbalance iónico. Las altas concentraciones del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pueden activar diferentes enzimas como fosfolipasas (para la degradación de la membrana celular y formar ácidos grasos libres) proteasas (para degradar proteínas de membrana), DNAsas (como las Caspasas, enzimas encargadas de la degradación del material genético en condiciones de muerte celular), Sintetasas de Óxido Nítrico (NOS), estas enzimas llevan a cabo la conversión de L-Arginina a L-Citrulina y Óxido Nítrico, y durante el desarrollo patológico la excesiva presencia de Ca^{2+} sobre-estimula la actividad de la Sintasa del Óxido Nítrico (NOS) provocando que el óxido nítrico (NO) sintetizado funcione como un agente pro-oxidante y esta misma sobrecarga celular de Ca^{2+} modifica la actividad mitocondrial al punto de alterar funciones como la fosforilación oxidativa liberando enzimas de la cadena transportadora de electrones como el Citocromo c oxidasa (CcOx) (complejo III de la cadena transportadora de electrones) este es un agente apoptótico, en estas condiciones el transporte de electrones no se lleva a cabo

correctamente, y es inevitable la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), ambos agentes pro-oxidantes (NO y O_2^-) reaccionan para generar una molécula con alto poder oxidativo, el peroxinitrito ($ONOO^-$) en un ambiente de acidosis como el que se presenta en la isquemia se vuelve aún más reactivo e inestable. El $ONOO^-$ puede interactuar con lípidos de la membrana potencializando el daño celular y aunado a la alta actividad de las fosfolipasas (PL's) el fenómeno de la Lipoperoxidación (LPO) se hace presente, los ácidos grasos libres sufren fragmentación y oxidación por las altas concentraciones de ROS y otra condición que favorece la LPO es la reacción Fenton, en donde metales como el hierro (Fe) presente en hemoproteínas (CcOx, hemoxigenasas, etc.) permite la formación de más ROS, los productos finales de la LPO son moléculas relativamente pequeñas como el Malonildialdehído (MDA) y 4-Hidroxi-alquenos (4-HDA), ambas moléculas pueden desencadenar fenómenos que finalizan en la muerte celular (**Flores-Soto et al., 2011; Lipton, 1999; Samdami et al., 1997; Ayala et al., 2014; Massaad & Klann, 2011**) (ver figura 3).

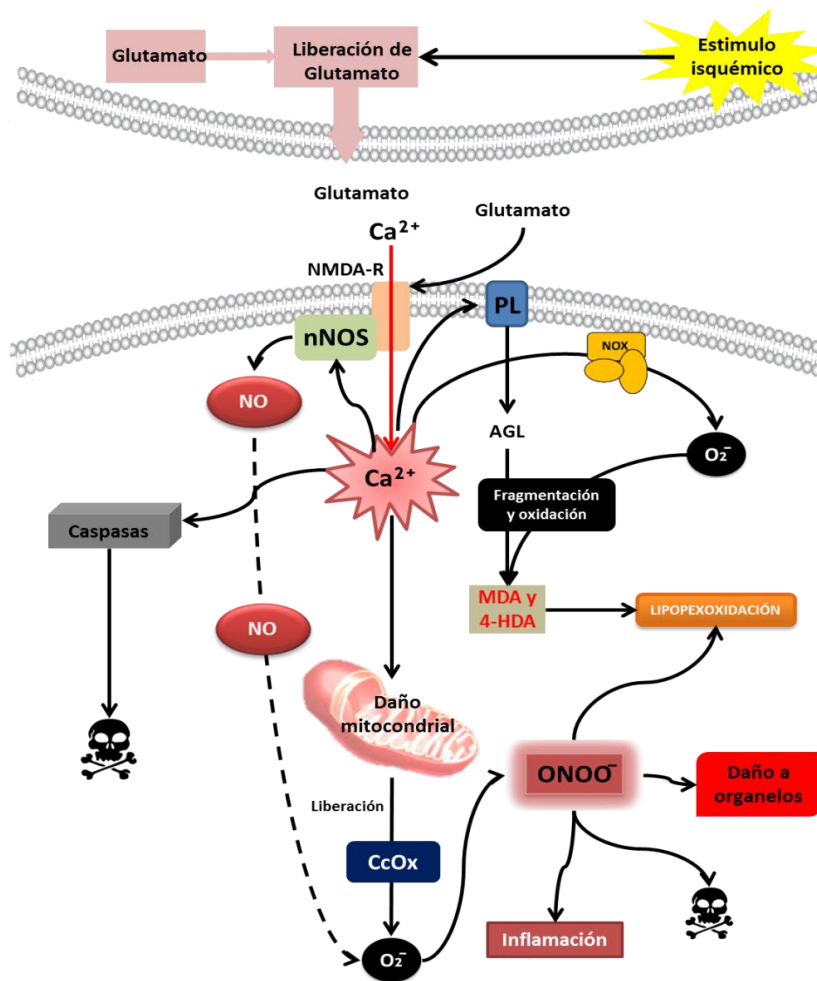


Figura 3. Mecanismo propuesto para explicar la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad en isquemia cerebral. NMDA, N-metil-D-Aspartato; PL, Fosfolipasa; AGL, Ácidos Grasos Libres; Ca^{2+} , Calcio iónico; Na^+ , Sodio iónico; ROS, Reactive Oxygen Species en inglés (Especies reactivas de Oxígeno); O_2^- , anión superóxido; NO, Óxido Nítrico; $ONOO^-$, peroxinitrito; CcOx, Citocromo c Oxidasa; nNOS, Sintasa del Óxido Nítrico Neuronal; MDA, Malonildialdehído; 4-HDA, 4-Hidroxiacetaldehído; (modificado de Flores-Soto et al., 2009).

11. Sintetasas del Óxido Nítrico (NOS)

Las enzimas que sintetizan NO comprenden una familia de óxido-reductasas que utilizan la L-Arginina (L-Arg) y oxígeno molecular (O_2) para generar L-Citrulina y Óxido Nítrico (NO). Las isoformas constitutivas de la Sintasa del Óxido Nítrico endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) son activadas con concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$, mientras que la isoforma inducible (iNOS) muestra una alta afinidad al Calcio intracelular (el calcio debe unirse a la Calmodulina para generar un complejo Calcio/Calmodulina (Ca^{2+}/CaM) para activar a la NOS) y activar a la Sintasa (Alexander et al., 2013; Daff et al., 2010).

La tres isoformas de la NOS son homodímeros que requieren la presencia de cofactores enzimáticos como la Tetrahidrobiopterina (5,6,7,8-tetrahidrobiopterina: BH₄), Dinucleótido de Nicotinamida Adenin Fosfato (NADPH⁺), Flavin Adenin Dinucleótido (FAD) y Flavin Mononucleótido (FMN) **(Alderton et al., 2001; Daff et al., 2010; Knowles & Mocanda, 1994; Li & Poulos, 2005)**. Estructuralmente la NOS está conformada por dos monómeros, para que la NOS inicie su actividad es necesaria la unión de ambos monómeros para formar el homodímero **(Li & Poulos, 2005)**. Cada monómero consta de dos dominios, uno reductasa y otro oxidasa. El dominio reductasa tiene sitios específicos de unión para el complejo Ca²⁺/CaM, NADPH⁺, FMN y FAD, estos dos últimos permiten el flujo de electrones a través del dominio reductasa al dominio oxidasa para que se lleve a cabo la reacción enzimática **(Rousseau et al., 2005)**, mientras que en el dominio oxidasa se encuentra el grupo Hemo (sitio catalítico) **(Alderton et al., 2001; Daff et al., 2010; Li & Poulos, 2005; Rousseau et al., 2005)**. Para que la NOS funcione adecuadamente es necesaria su estabilización, lo cual se lleva a cabo con la presencia de cofactores como el Zinc (Zn²⁺) que se une coordinadamente con dos residuos de Cisteína (un residuo de cada monómero), este fenómeno modifica la unión de la BH₄ y L-Arg y el correcto funcionamiento enzimático de la NOS y la BH₄ la cual funciona como un cofactor redox para la reducción de radicales libres que se puedan generar en la reacción enzimática **(Alderton et al., 2001; Föstermann & Sessa, 2012; Li & Poulos, 2005)** (ver figura 4).

La nNOS se expresa esencialmente en tejido neuronal, su actividad está regulada por Ca²⁺/CaM **(Föstermann & Sessa, 2012; Mungrue & Bredt, 2004)**. La función de la nNOS en el cerebro y el sistema nervioso central (SNC) es regular la presión sanguínea **(Föstermann & Sessa, 2012; Kopincová et al., 2011; Mungrue & Bredt, 2004)**. Además el NO derivado de la nNOS funciona en la señalización de la plasticidad neuronal, incluyendo la LTP en el hipocampo y juega un papel importante en el estrés y la respuesta adaptativa del organismo **(Kopincová et al., 2011; Mungrue & Bredt, 2004)**.

La eNOS está altamente expresada en células endoteliales a lo largo y ancho del sistema circulatorio y en células del musculo liso **(Föstermann & Sessa, 2012; Kopincová et al., 2011)**. La función de la eNOS incrementa cuando las

concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ aumentan por estrés (Kopincová et al., 2011). La eNOS tiene una variedad de funciones fisiológicas, incluyendo la vasodilatación (Mungrue & Bredt, 2004), inhibición de la adhesión leucocitaria y plaquetaria (Föstermann & Sessa, 2012; Kopincová et al., 2011) y controla la angiogénesis (Carnicer et al., 2013; Föstermann & Sessa, 2012).

La iNOS no es usualmente expresada en mucho tejidos, pero si en la microglía (Garthwaite, 2008; Kopincová et al., 2011; Knott & Bossy-Wetzel, 2009), astrocitos (González-Barrios et al., 2002; Pannu & Singh, 2006) y macrófagos (Föstermann & Sessa, 2012; Kopincová et al., 2011; Wang & Leigh, 2006). En condiciones patológicas como en el proceso de inflamación, células como hepatocitos (Kopincová et al., 2011), cardiomiocitos (Carnicer et al., 2013) células del epitelio bronquial (Wang & Leigh, 2006) y células del musculo liso también la pueden expresar (Kopincová et al., 2011).

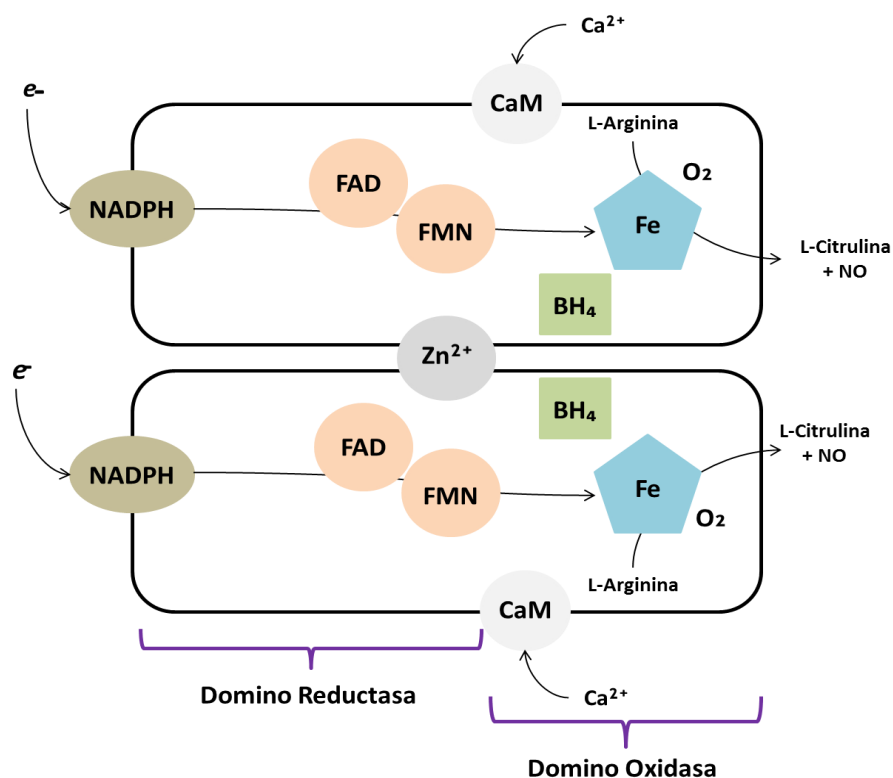


Figura 4. Representación del funcionamiento y estructura de la Sintasa del Óxido Nítrico (Vitecek et al., 2012). →, flujo de electrones; e^- , electrón; NADPH, Dinucleótido de Nicotinamida Adenin Fosfato; FAD, Flavin Adenin Dinucleótido; FMN, Flavin Mononucleótido; CaM, Calmodulina; Ca^{2+} , Calcio iónico; BH_4 , Tetrahidrobiopterina (5,6,7,8-tetrahidrobiopterina); Zn^{2+} , Zinc cofactor enzimático; Fe, Hierro del grupo Hemo; NO, Óxido Nítrico.

12. Óxido Nítrico (NO)

El NO es sintetizado a partir de la L-Arginina por las NOS en dos etapas de monooxigenación separadas: en la primera etapa se da la unión de la L-Arginina al sitio activo de la NOS para convertirla en N- ω -hidroxiarginina (NHA) como intermediario para poder llevar a cabo la reacción en esta etapa es necesario oxígeno molecular (O_2), NADH y Tetrahidrobiopterina (BH_4) y en la segunda etapa ocurre una oxidación de NHA a L-Citrulina y NO (**Daff, 2010; Ghasemi & Zahedials, 2011; Li & & 2005; Pannu & Singh, 2006**).

La tasa de formación del NO difiere entre especies, 0.33-0.85 $\mu\text{mol/kg/h}$ en ratas Wistar y 0.9 $\mu\text{mol/kg/h}$ o incluso alrededor de 1mmol/día en humanos (**Ghasemi & Zahedials, 2011**). En plasma, el NO es oxidado casi completamente convertido a Nitritos (NO_2^-), los cuales son estables hasta por 3h en condiciones experimentales a partir de homogenado de cerebro (**Kader et al., 1993; Chao et al., 1992**).

12.1 Funciones del Óxido Nítrico en el cerebro

El NO es conocido como una especie química de naturaleza gaseosa que se encuentra prácticamente en cualquier tejido desempeñado diversos papeles el cuerpo humano (**Hall & Garthwaite, 2009**). Conocido también como Factor Relajante Derivado del Endotelio (por sus siglas en ingles EDRF, Endotelial Derived Relax Factor), es un potente vasodilatador y considerado como regulador clave en la homeostasis vascular, control de la angiogénesis, aterogénesis y de la presión sanguínea a nivel periférico y central, además es una especie química presente en la células del sistema inmune (**Pannu & Singh, 2006; Wang & Leigh, 2006**).

En el cerebro, el NO participa en la transmisión neuronal, neurogénesis (amplificación y mantenimiento de la plasticidad neuronal) (**Gallo & Iadecola, 2011**), desarrollo del aprendizaje y la memoria (**Frederickson et al., 2002; Hall & Garthwaite, 2009; Li et al., 2012; Pitsikas, 2014; Moosavi et al., 2014; Harooni et al., 2009**) y permite el funcionamiento y desarrollo de la LTP (**Hall & Garthwaite, 2009; Hardingham et al., 2013; Li et al., 2012; Pitsikas, 2014; Moosavi et al., 2014**). En el

cerebro la nNOS presenta una alta actividad (**Knowles & Mocanda, 1994**), y el NO producido es considerado como un neurotransmisor atípico, en condiciones normales las concentraciones basales de NO son producidas en la terminal presináptica debido al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por un estímulo externo, el aumento en las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ facilita la movilización en la liberación de glutamato por transporte vesicular hacia la sinapsis, al liberarse el glutamato en la sinapsis, éste se une a los receptores NMDA en la terminal post-sináptica y permite la entrada masiva de Ca^{2+} para favorecer la formación del complejo Ca^{2+}/CaM y entonces así puede activarse la nNOS (**Flores-Soto et al., 2011**). Al no almacenarse el NO puede difundir y llegar a sus objetivos en las neuronas circundantes y activar mecanismos que propician el ambiente correcto para la neurogénesis, transmisión neuronal y LTP (**Pacher et al., 2009**).

12.2 Función del óxido nítrico en el aprendizaje

A nivel molecular, el aprendizaje y la memoria pueden ser comprendidos por medio de la potenciación a largo plazo (por sus siglas en ingles LTP, Long-Term Potentiation), en donde el glutamato y el Adenosin Monofosfato cíclico (cAMP) participan en la estimulación sináptica continúa para generar una cascada de eventos neurológicos. Se ha demostrado que en las neuronas del hipocampo, la liberación del glutamato promueve la entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) a través de los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), esto activa la Adenilato Ciclasa (AC), que induce la formación de cAMP a nivel post-sináptico (**Kandel, 2012; Waltereit & Weller, 2003**).

El incremento en la concentración post-sináptica de cAMP activa la Proteína Cinasa-A dependiente de cAMP (PKA), que a su vez activa a la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (MAKP). Esta se trasloca al núcleo para fosforilar proteínas y factores de transcripción como el Elemento de Respuesta al cAMP (CREB), responsable de inducir la expresión de proteínas específicas para aumentar la excitabilidad de las neuronas, formación de nuevas sinapsis y el mantenimiento de las ya existentes, con el objeto de mantener activos los mecanismos neurológicos de la memoria (**Kandel, 2012; Waltereit & Weller, 2003; Giese & Mizuno, 2013**).

Otro posible mecanismo involucrado en la LTP, es la participación de la Vía NO-cGMP-PKG. Un punto en común entre estas vías y el fenómeno celular antes descrito es la participación del glutamato por la activación de los receptores NMDA, la entrada de Ca^{2+} a la terminal post-sináptica para la activación de diferentes proteínas cinasas y el NO, en ambas vías de señalización estos tres puntos son pilares para el desarrollo de la cascada de eventos celulares **(Garthwaite, 2008; Moosavi et al., 2014; Harooni et al., 2009)**.

El NO tiene una acción retrograda, uno de sus blancos es la Guanilato Ciclasa (GC), enzima que se encarga de la reacción de ciclación del Guanosín Trifosfato (GTP) a Guanosín Trifosfato Mono Cíclico(cGMP), el cGMP puede activar proteínas como la Proteína Kinasa de tipo G dependiente de cGMP(PKG) **(Garthwaite, 2008, Harooni et al., 2009; Moosavi et al., 2014)**, esta vía de activación también es conocida como Vía NO-cGMP-PKG **(Francis et al., 2010; Gallo & Iadecola, 2011; Harooni et al., 2009; Matsumoto et al., 2006)**, a su vez esta activación permite la promoción de vías de señalización como la ERK1/2, CREB y TORC-1 que permiten la transcripción de genes que codifican para factores de crecimiento como BDNF, NGF y IGF **(Gallo & Iadecola, 2011)** y que son referidos como genes asociados a la plasticidad sináptica **(Waltereit & Weller, 2003)** (ver figura 5).

De forma paralela el Zinc (Zn^{2+}) puede tener actividad tanto a nivel membranal como a nivel nuclear, estudios indican que el Zn^{2+} regula la actividad del receptor NMDA y procesos como la proliferación neuronal en condiciones como el desarrollo del Aprendizaje y la Memoria **(Frederickson et al., 2002; Takeda, 2014)**.

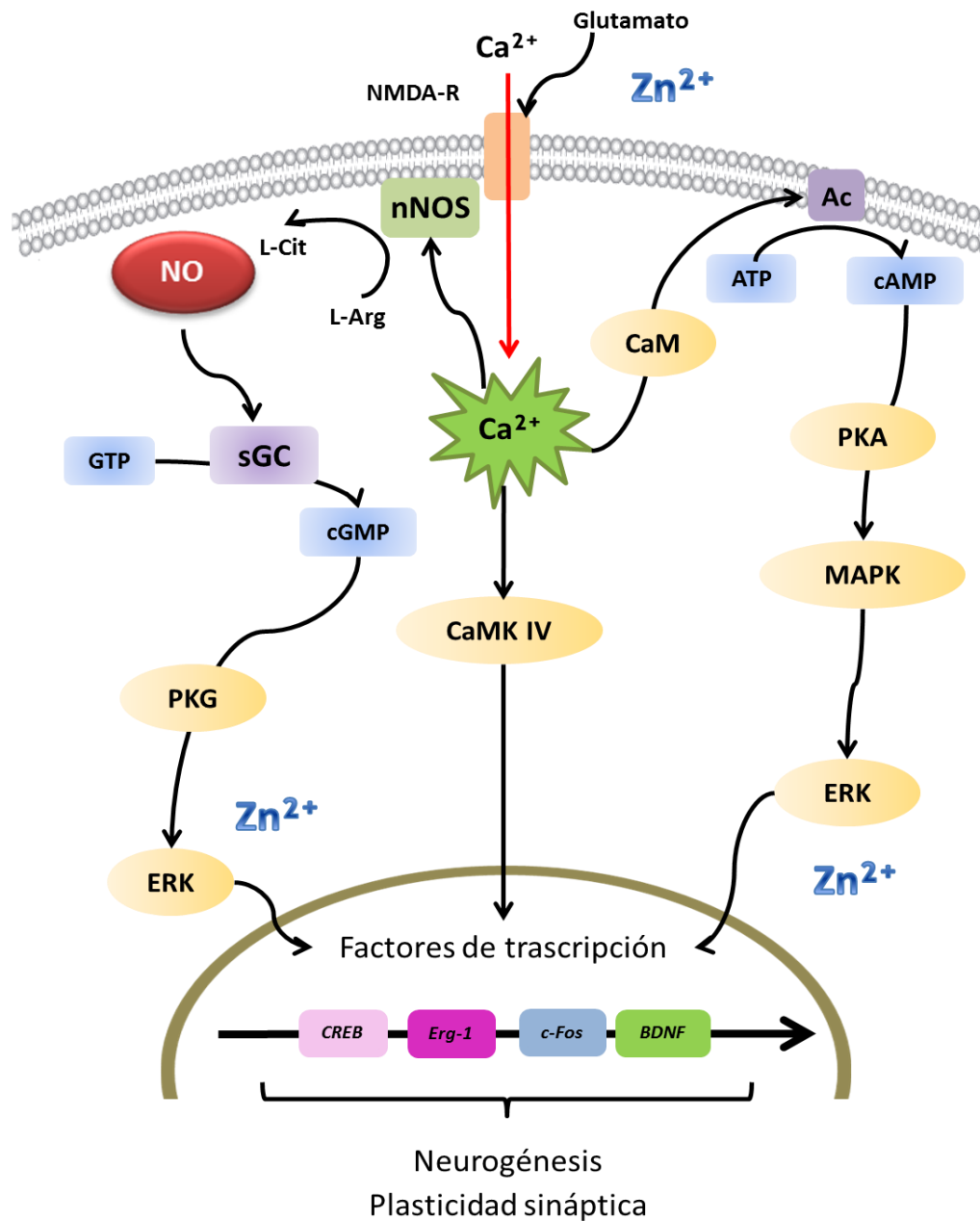


Figura 5. Vías de señalización involucradas en la promoción de la neurogénesis y plasticidad sináptica para desarrollar la potenciación a largo plazo. NMDA, N-metil-D-Aspartato; Ca^{2+} , Calcio iónico; nNOS, Sintasa del óxido Nítrico; L-Arg, L-Arginina; L-Cit, L-Citrulina; NO, Óxido Nítrico; sGC, Guanilato Ciclasa soluble; GTP, Guanósín Trifosfato; cGMP, Guanósín Monofosfato cíclico; PKG, Proteína Cinasa dependiente de cGMP; ERK, Cinasa de señales extracelulares; CaMK IV, Calmodulina Cinasa IV; CaM, Calmodulina; Ac, Adenilato Ciclasa; ATP, Trifosfato de Adenina; cAMP, Monofosfato de Adenosina cíclico; PKA, Proteína Cinasa dependiente de cAMP; MAPK, Proteína Cinasa Activada por Mitógenos; CREB, Elemento de Respuesta al cAMP; BDNF, Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro; Zn^{2+} , Zinc iónico (modificado de **Kandel, 2012** y **Waltereit & Weller, 2003**).

12.3 El óxido nítrico en condiciones isquémicas

La isquemia cerebral induce múltiples y distintos cambios en el contenido de NO cerebral y su señalización. Estudios con modelos de oclusión de la arteria media cerebral muestran un incremento en la producción del NO de hasta 20 veces por encima de los niveles basales en los primeros 30 minutos como consecuencia de la reperusión la concentración de NO podría aumentar transitoriamente hasta 50% **(Terpolilli et al., 2012)** detectable 12h después de la isquemia cerebral con un pico máximo a las 48h **(Samdami et al., 1997)**. La formación de NO derivado de la nNOS y eNOS es transitoria y con bajas concentraciones por largos periodos siendo activada por altas las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$, pero la iNOS puede generar altas concentraciones de NO por periodos y con alta afinidad al Ca^{2+} **(Moncada & Bolañoz, 2006; Knott & Bossy-Wetzel, 2009; Pacher et al., 2009)**. La iNOS y la nNOS han sido asociadas con efectos neurotóxicos en el infarto cerebral **(Warner et al, 2004; Pacher et al., 2009; Liu et al., 2014)**. La sobre-producción de NO por una estimulación excesiva o inapropiada de las isoformas nNOS y iNOS lo cual es un componente esencial que provoca daño por estrés oxidativo/nitrosativo **(Samdami et al., 1997)**.

El estrés oxidativo ha sido definido como un desbalance pro y antioxidativo en favor de las sustancias que conducen a un daño potencial **(Sies, 2015)** con la subsecuente pérdida de la homeostasis redox **(Soneja et al., 2005)**. El peroxinitrito ($ONOO^-$) es la principal especie reactiva de nitrógeno (por sus siglas en inglés, RNS, “Reactive Nitrogen Species”) detectada en sistemas biológicos **(Soneja et al., 2005)**, el estrés nitrosativo representa la principal fuente de daño directo a macro-moléculas celulares como DNA, proteínas y lípidos **(Knott & Bossy-Wetzel, 2009; Kalogeris et al., 2012)**.

El cerebro consume altas concentraciones de O_2 haciéndolo particularmente susceptible al estrés oxidativo **(Warner et al., 2004)** y tal como sucede en procesos hipóxicos-isquémicos la concentración del O_2 disminuye en las células cerebrales generando daño irreversible **(Kalogeris et al., 2012)**. La altas concentraciones intracelulares de NO producidas en la isquemia permiten la inhibición del citocromo c oxidasa (enzima que participa en la Cadena transportadora de electrones) y con ello

hay un aumento en la generación de O_2^- en la mitocondria. Durante los procesos inflamatorios existe una interrupción en la transferencia de electrones en el citocromo oxidasa lo que incrementando marcadamente la falta de electrones en la cadena transportadora, resultando en un aumento en la formación de O_2^- dentro de la matriz mitocondrial y con ello el aumento de la producción de $ONOO^-$ convirtiendo a la mitocondria en una fuente potencial de ROS (**Pacher et al., 2009**). La concentración de NO en condiciones patológicas se encuentra elevada, debido a que la terminal presináptica recibe una sobre-estimulación debida al daño celular o inflamación, entonces se presenta una liberación excesiva de glutamato a la sinapsis provocando una excitotoxicidad que de igual manera sobre-activa a los receptores a Glu en las terminales post-sinápticas. La sobre-activación de los receptores a Glu es uno de los procesos implicados en procesos de neurodegeneración y muerte celular. La elevación del $[Ca^{2+}]_i$ promueve fenómenos tóxicos como la lipoperoxidación (LPO) de membrana plasmática, el retículo endoplasmático y la mitocondria, llevando así al fallo celular (**Flores-Soto et al., 2012**), (ver figura 6).

La lesión cerebral causada por la isquemia cerebral activa un proceso inflamatorio que se exacerba por la presencia de citocinas pro-inflamatorias como interleucinas (IL-1, IL-6), Interferón γ y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), principales moléculas de daño celular (**Talarowska et al., 2012**), aunado a la excitotoxicidad provocada por el Glutamato (**Flores-Soto et al., 2011**) y el desbalance redox inclinado por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species, ROS) (**Violi et al., 1999**). La producción de ROS hace inminente la disrupción de membranas neuronales. Los ácidos grasos presentes en células cerebrales son altamente susceptibles al estrés oxidativo y forman ahora ácidos grasos libres, con el fin de convertirse en aldehídos de alta toxicidad como Malonildialdehído (MDA) y 4-Hidroxiacetalquenos (4-HDA), ambos son considerados como marcadores de daño celular directos del proceso de lipoperoxidación (LPO) que reflejan la severidad del daño celular, ambas moléculas juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades del Sistema Nervioso Central tal como en el infarto isquémico (**Talarowska et al., 2012**) (ver figura 6).

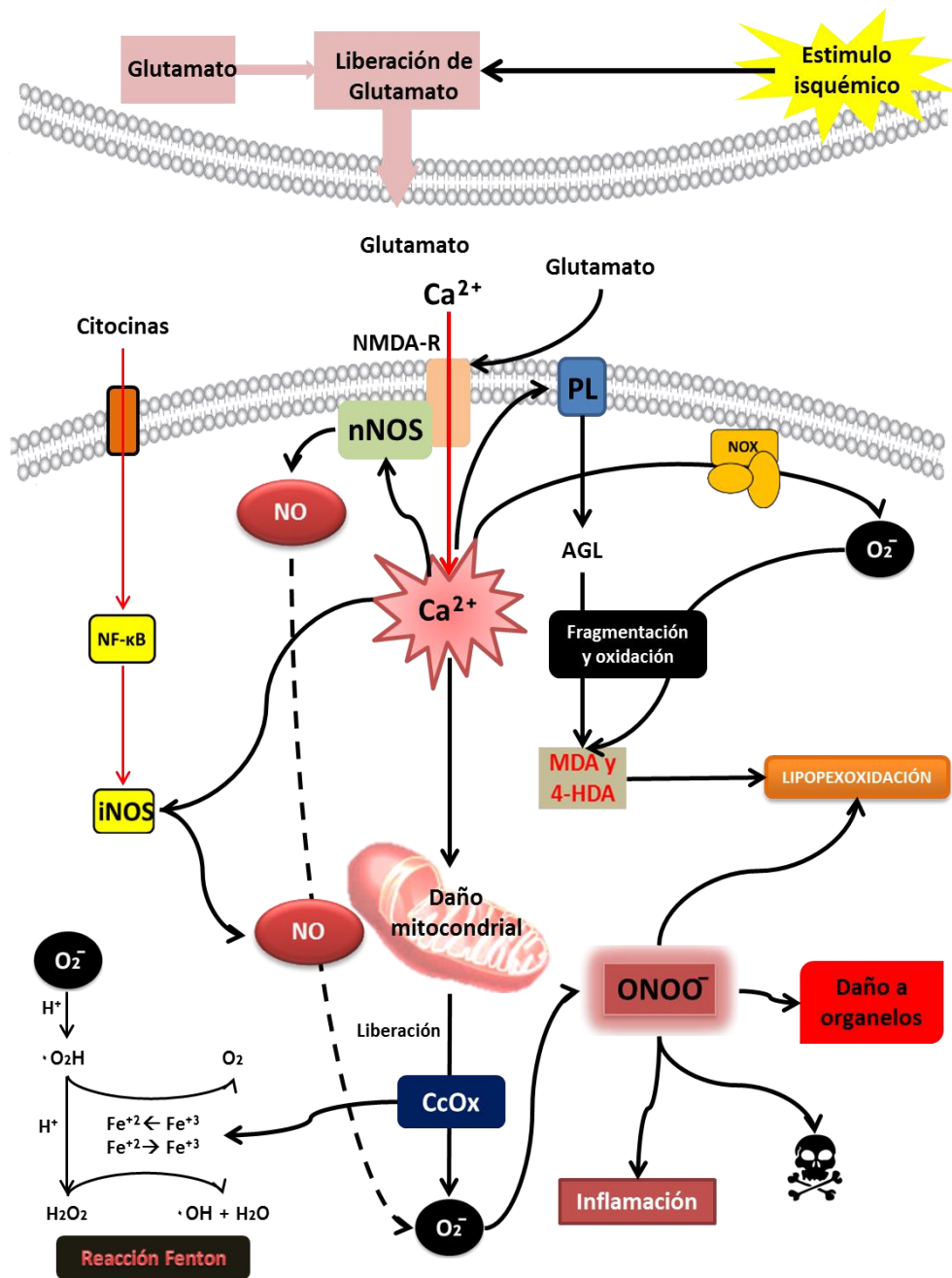


Figura 6. La lipoperoxidación desencadena diversos mecanismos que potencializan el daño celular, la reacción Fenton y no Fenton promueven el Estrés Oxidativo llevando a la muerte celular. NMDA, N-metil-D-Aspartato; PL, Fosfolipasa; AGL, Ácidos Grasos Libres; Ca²⁺, Calcio iónico; ROS, Reactive Oxygen Species en inglés (Especies reactivas de Oxígeno); O₂⁻, anión superóxido; NO, Óxido Nítrico; ONOO⁻, peroxinitrito; CcOx, Citocromo c Oxidasa; NF-κB, Factor Nuclear κ activado por células B; H⁺, Hidrogeno; H₂O₂, Peróxido de Hidrógeno; O₂, Oxígeno Molecular; H₂O, Agua; \cdot O₂H, Radical Peroxil; \cdot OH, Radical Hidroxil; nNOS, Sintasa del Óxido Nítrico Neuronal; iNOS, Sintasa del Óxido Nítrico Inducible; MDA, Malonildialdehído; 4-HDA, 4-Hidroxialquenos (modificado de Flores & Soto et al., 2012).

13. Lipoperoxidación en Hipoxia-Isquemia

Las condiciones inflamatorias presentes en el infarto isquémico promueven la activación de diversas proteínas y enzimas que potencializan la inflamación. Debido a la exacerbación de la lesión cerebral, es inminente la activación de iNOS y con ello aumenta la síntesis de NO de manera neurotóxica además de que el sistema antioxidante de las enzimas como las Superóxido Dismutasa (SOD) disminuye (**Chen et al., 2011**), la dismutación del ion superóxido (O_2^-) no se lleva a cabo adecuadamente por lo cual aumentan las concentraciones de O_2^- , la desregulación de la circulación cerebral compromete la perfusión en el cerebro post-isquemia y provoca un incremento en el daño cognitivo, también se sabe que los niveles de O_2^- en la circulación cerebral se elevan sustancialmente durante la fase inicial de la reperfusión post-isquemia y que este estado del estrés oxidativo puede persistir por varios días (**De Silva et al., 2011**), haciendo que el NO se comporte como un agente pro-oxidante (**Soneja et al., 2005; Violi et al., 1999**). La presencia del $ONOO^-$ es indicativo de procesos como la lipoperoxidación, lo que promueve el daño celular (**Pacher et al., 2009; Warner et al., 2004; Soneja et al., 2005; Kalogeris et al., 2012; Erusalimsky & Mocanda, 2007**). Uno de los blancos de acción del $ONOO^-$ es la membrana lipídica a través de la nitración de proteínas y lípidos de la membrana iniciando el proceso de lipoperoxidación (**Gahm et al., 2005**). La alteración de la integridad de la membrana plasmática se presenta debido a la alteración de procesos fisiológicos en receptores y canales iónicos comprometiendo la constitución de la membrana celular. Tanto el O_2^- como el $ONOO^-$ pueden reaccionar con los ácidos grasos libres generando radicales libres de ácidos grasos e hidroperóxidos, estos pueden sufrir reacciones como ciclación, reacción que conduce a la oxidación de los productos lipídicos hasta la formación del MDA (Malonildialdehído), un producto altamente mutagénico y tóxico considerado como un biomarcador del estado oxidativo celular (**Ayala et al., 2014**) con viabilidad para ser cuantificado en muestras biológicas (**Gerard-Monnier et al., 1998**). Otro producto final de la LPO son los 4-Hidroxiálquenos (4-HDA), moléculas altamente tóxicas que regula la actividad oxidativa y de proteínas como el Factor Nuclear κ activado por las células B (NF- κ B), (**Ayala et al., 2014; Mocanda & Bolaños, 2006; Kopincová et al., 2012**). La presencia de metales (provenientes de sitios activos de enzimas que participan en la

reacción de óxido-reducción como el citocromo c oxidasa, hemooxidasas, hemoglobina, Citocromo P450, etc.) propician un ambiente oxidante para que se lleve a cabo la reacción Fenton y no Fenton, las cuales promueven el estado oxidativo celular y con ello las concentraciones de radicales libres inducida por ROS y RNS (**Ayala et al., 2014; Mocanda & Bolaños, 2006; Kalogeris et al., 2012; Erusalimsky & Mocanda, 2007**) exacerbando el daño celular con la consecuente alteración de procesos celulares como la comunicación neuronal, llevando a un déficit neurológico (**Talarowska et al., 2009**). En modelos de hipoxia-isquemia este aumento de LPO lleva a la disminución celular en corteza (**Aguilar-Alonso et al., 2008**) y en la región CA1 de hipocampo (**Blanco-Alvarez et al., 2013**).

14. Zinc en la Hipoxia-Isquemia

El Zinc (Zn) es un bioelemento abundante en diversos organismos, es un metal de transición inocuo que participa en procesos fisiológicos de vital importancia, como ion libre (Zn^{2+}), unido a proteínas o como cofactor enzimático (**Shuttlerwood & Weiss, 2011; Levenson, 2014**). El Zinc puede unirse a compuestos formando complejos, esta característica permite al Zinc poder ser cuantificado por métodos colorimétrico (**Johnson et al., 1977**).

El zinc se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo, participa en la LTP en regiones del hipocampo (fibras musgosas que interconectan CA3-CA1) (**Takeda, 2014**). Debido a que durante la transmisión sináptica tras un estímulo, se lleva a cabo la liberación de glutamato a la sinapsis, de igual manera, el Zn también se libera, es decir, que las vesículas glutamatérgicas contienen Zn (**Galasso et al., 2011; Takeda, 2014**), entonces también se pueden activar mecanismos que llevan a la toxicidad por Zn en procesos de hipoxia-isquemia (**Koh et al., 1986**). Takeda (**2014**) observó que un incremento en las concentraciones de Zn promueve un déficit cognitivo y pérdida de función celular. Por su parte, Blanco-Alvarez, 2013 [**Tesis de Maestría**] demostró que la administración subaguda de $ZnCl_2$ (2.5mg/kg 96h antes de la Obliteración de la arteria carótida primitiva, OACP) regula positivamente factores de crecimiento (IGF-1 y FGF-2) y disminuye la presencia de Nitrotirosina, lo cual sugiere supervivencia

neuronal. De manera similar Beltrán Galindo, 2010 [**Tesis de Licenciatura**] demostró que el mismo tratamiento disminuye la presencia de marcadores de daño celular (Nitritos; MDA y 4-HDA) en la fase temprana del daño isquémico. Ambos resultados concuerdan con lo observado en el trabajo de Matsushita et al. (1986). Los resultados de estos trabajos dejan entrever el papel citoprotector del Zn en procesos hipóxico-isquémicos.

Justificación

Las accidentes cerebrovasculares (ACV's) son una de las principales causas de incapacidad neurológica y muerte en la población económicamente activa **(OMS, 2014; Woodruff et al., 2013; Pandya et al., 2011)**.

Diversos estudios han mostrado que el NO tiene efectos citoprotectores **(Cormac & Moncada, 2009; Knott & Bossy-Wetzel, 2009)** y citotóxicos **(Moncada & Bolaños, 2006; Soneja et al., 2005)** que afectan de manera directa aspectos cognitivos del individuo como lo son el aprendizaje y la memoria **(Frederickson et al., 2002; Hall & Garthwaite, 2009; Pitsikas et al., 2014; Moosavi et al., 2014)**. El efecto negativo del NO es atribuido a la combinación con el anión superóxido (O_2^-) **(Pacher et al., 2009)** y la aparición del peroxinitrito y los radicales libres activan procesos de lipoperoxidación dañando diversas células y estructuras relacionadas con el aprendizaje y la memoria **(Busl & Greer, 2010, Aguilar-Alonso et al., 2008; Blanco-Alvarez et al., 2013)**. Tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral se lleva a cabo un incremento en la formación de NO al que se le ha atribuido efectos neurotóxicos que contribuyen a la patogénesis del infarto y otros desórdenes neurológicos agudos y crónicos, lo que nos lleva a reconocer al NO como una molécula clave en la señalización celular provocada por el proceso inflamatorio **(Kader et al., 1993; Soneja et al., 2005)**.

Las NOS tiene mucha relevancia tanto en la fase temprana como en la fase tardía del daño isquémico, por lo cual esta enzima ha sido un objetivo farmacológico. El uso de inhibidores de NOS disminuye la actividad de las Sintetasas **(Caldwell et al., 1996; Wei et al., 1999; Alderton et al., 2001)** disminuyendo la producción de NO y sus metabolitos en modelos de obstrucción sanguínea **(Seif-EI-Nars & Fahim, 2000; Awooda et al., 2013; Grandati et al., 1997; Aguilar-Alonso et al., 2008)**, la formación de 3-Nitrotirosina **(Gahm et al., 2005)** y aminora el volumen de infarto, proponiendo al L-NAME como un posible tratamiento que ayude a conservar funciones cognitivas y que mantenga el aprendizaje y la memoria en modelos de daño isquémico **(Buisson et al., 1992; Margail et al., 1997; Mohammadi et al., 2011)**.

Con lo antes mencionado, es pertinente estudiar qué efecto tiene el NO en el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en un modelo animal de experimentación ampliamente utilizado en rata.

Hipótesis

El incremento de NO causa un estrés oxidativo y nitrosativo que afecta aspectos cognitivos tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

Objetivo General

Determinar el efecto del óxido nítrico sobre el estrés oxidativo y nitrosativo en el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

Objetivos particulares

- 1.- Determinar si existe estrés nitrosativo tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata
- 2.- Evaluar el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata
- 3.- Determinar la participación del óxido nítrico sobre el estrés nitrosativo tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata
- 4.- Determinar la participación del óxido nítrico sobre el aprendizaje y la memoria tras un hipóxico-isquémico cerebral en rata

Materiales

Animales experimentales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (180-210g de peso corporal) obtenidas del Bioterio del CINVESTAV-IPN. Las ratas fueron mantenidas en condiciones controladas con ciclos de luz-oscuridad (12h-12h) y temperatura de 23°C, siempre con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos que se aplicados estuvieron de acuerdo con las normas de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio en México” y aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales (protocolo #109-02).

Animales de experimentación

Las ratas fueron separadas para formar los siguientes grupos (n=5): Control sin tratamiento, Control aprendizaje y Control Aprendizaje-memoria, Isquemia aprendizaje e Isquemia aprendizaje-memoria, L-NAME aprendizaje y L-NAME aprendizaje-memoria, Isquemia L-NAME aprendizaje e Isquemia L-NAME aprendizaje-memoria.

Administración de L- ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)

El L- ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) se administró en una sola dosis (10 mg/kg de peso corporal) vía intraperitoneal (i.p.) 25h antes de la evaluación en el laberinto acuático de Morris (solo Grupos Aprendizaje y Aprendizaje-Memoria) y 1h antes de la obliteración de la arteria carótida primitiva 10 minutos (OACP) (solo Grupos isquemia Aprendizaje e isquemia Aprendizaje-Memoria).

Entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris para evaluar el aprendizaje y la memoria en roedores

El Laberinto Acuático de Morris usado para evaluar aprendizaje y memoria fue proporcionado por el Laboratorio de Neurofarmacología (D.C. Ihuilcamina Daniel Limón Pérez de León). El laberinto cuenta con las siguientes dimensiones: la piscina tiene 200

cm de diámetro, 70 cm de altura de las paredes y la plataforma de 10 cm de diámetro como se muestra en la figura 7.

La evaluación del aprendizaje se desarrolló de la siguiente manera: se colocó a la rata de frente a la pared de la piscina en cuatro uno de los puntos marcados en la piscina (Norte, N; Oeste, O; Sur, S; Este, E y ese será el orden de evaluación) para que nadará y localizará la plataforma de escape, esto con un límite de tiempo de 60 s, el tiempo que les tomo a las ratas en cada uno de los puntos para encontrar la plataforma sumergida (tiempo de latencia) en el cuadrante Sureste se anotaron y graficaron. En el primer día de la evaluación, cuando la rata no encontró la plataforma de escape, fue guiada nadando hasta la plataforma (solo el primer día de evaluación). Cuando la rata halló la plataforma esta mantuvo 30 s en ella (N, O, S y E), la rata fue retirada de la piscina por 30 s más, llevando a cabo así 4 ensayos por día durante 5 días. Para evaluar la memoria, la rata fue colocada de frente a la pared de la piscina en el punto Oeste (punto más alejado de la ubicación imaginaria de la plataforma) y la piscina no contó con la plataforma de escape, se registró la frecuencia y el tiempo que la rata pasó por donde estaría la plataforma y para después graficar.



Figura 7. Laberinto Acuático de Morris. Propuesto por Richard Morris en 1982 y 1984 con la finalidad de evaluar los procesos de aprendizaje y memoria espacial en roedores en diferentes en diferentes condiciones fisiopatológicas y farmacológicas y en modelos de daño cerebral con el objetivo principal de evaluar la alteración del aprendizaje y la memoria y con ayuda de señales intra y extra-laberinto.

La evaluación del aprendizaje se realizó durante 5 días consecutivos (Grupos Aprendizaje) y la evaluación de la memoria se realizó en el día 7 después del último día de aprendizaje (Grupos Aprendizaje-Memoria).

La condiciones de trabajo para evaluar el aprendizaje y memoria en el Laberinto acuático de Morris fueron: la temperatura del agua en la piscina debió mantenerse a 22°C, el agua debió estar teñida con Oxido de Titanio para dar una apariencia turbia u opaca y el nivel del agua dentro de la piscina debe superar 1cm el nivel de la plataforma de escape, estas últimas dos condiciones son para evitar que la rata pueda ver el nivel superior de la plataforma.

Metodología

Protocolo de la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP)

Todos los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de (350 mg/k de peso corporal). La OACP se realizó inmediatamente y con cuidado de corroborar que la rata fue anestesiada correctamente. La disección se llevó a cabo a la altura del cuello, con ayuda de una incisión para encontrar la arteria carótida primitiva, se disectó y expuso para presionarla con un clamp (micropinza para arterias), la oclusión se mantuvo por 10 minutos. Al término de la obliteración se retiró el clamp de la arteria para reconstituir el flujo sanguíneo. La incisión fue suturada y las ratas se mantuvieron bajo cuidado hasta su completa recuperación.

Obtención de cerebros

Las ratas fueron sacrificadas en el último día de evaluación de aprendizaje (solo Grupos de Aprendizaje) y 7 días después del último día de evaluación de aprendizaje (solo Grupos de Aprendizaje-Memoria). Para poder obtener los cerebros se les practicó la eutanasia para obtener el órgano íntegro, posteriormente la región temporo-parietal del hemisferio izquierdo, después fueron colocadas en tubos de 2 mL (Eppendorf) para ser almacenadas en ultracongelación (-70°C) hasta su evaluación bioquímica.

Procesamiento de las muestras

Las cortezas temporo-parietales izquierdas fueron homogenizadas con PBS 1X (relación 1mL) frío con ayuda de un homogenizador eléctrico por un minuto y evitando

que la muestra elevará su temperatura, los homogenizados fueron centrifugados en una ultracentrífuga refrigerada a 12500 rpm a 4°C por 30 minutos para poder obtener el sobrenadante que fue utilizado para llevar a cabo las cuantificaciones bioquímicas.

Evaluación bioquímica

1.- Cuantificación de los niveles de Proteínas totales (Sedmak et al., 1977)

El anión del colorante Azul de Coomassie reacciona con el grupo amino (NH_3^+) de las proteínas, esta unión electrostática causa el cambio en la absorción del colorante en solución de 465-620 nm. Los niveles de proteínas totales fueron cuantificados por el método de Sedmark y Grossberg (Sedmak et al., 1977) utilizando los siguientes volúmenes: 1 μL del sobrenadante contenidos en 499 μL de agua destilada y 500 μL del reactivo de color (azul de Coomassie 0.06%). El producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000) a 620 nm.

La concentración de proteínas fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de albumina (1-10 μg) (Anexo), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

2.- Cuantificación de los niveles de Malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehído (4-HDA) (Gerard-Monnier et al., 1998)

Los niveles de MDA y 4-HDA fueron cuantificados por el método de Gerard-Monnier [Gerard-Monnier et al., 1998]. Esta determinación se basa en la reacción entre el N-metil-2-fenilindol con el MDA y los 4-HDA a 45°C, es decir, una molécula de MDA o de 4-HDA reacciona con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol formando un cromóforo estable que absorbe a 586 nm. El empleo de esta longitud de onda y de la temperatura de incubación (45°C) minimiza las interferencias presentes en otros métodos para determinar aldehídos derivados del proceso de la lipoperoxidación.

Para cuantificar los niveles de lipoperoxidación se tomaron 100 μL de sobrenadante del cerebro, se le adicionaron 650 μL de solución I (compuesta de N-metil-2-fenilindol a una concentración 10.3 mM en acetonitrilo y metanol) más 100 μL

de agua destilada y 150 μL de ácido metanosulfónico. Las muestras se agitaron e incubaron por 1 h en baño María, después de la incubación las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000) a 586 nm. La concentración de MDA y 4-HDA fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva patrón de MDA, 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (Anexo), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

3.- Cuantificación de los niveles de nitritos (Chao et al., 1992)

Este método se basa en la reacción del analito en medio acuoso para formar una sal de diazonio soluble que se acopla a aminas aromáticas produciendo un colorante azo (Diazotación de Griess). Esta reacción colorimétrica es fácilmente monitoreada por medio de espectrofotometría.

La concentración de óxido nítrico (NO) fue estimada a través del contenido de nitritos (NO_2^-) en los sobrenadantes de cerebro utilizando el método de Griess [Chao et al., 1992]. El reactivo de Griess está compuesto de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-naftiletildiamina (0.1%) disuelto en agua destilada y sulfanilamida (1.32%) disuelta en ácido acético glacial (60%). La reacción fue leída en un espectrofotómetro Biorad SmartSpect 3000.

Los niveles de nitritos (NO_2^-) de los sobrenadantes de cerebro fueron determinados utilizando los siguientes volúmenes: 100 μL de sobrenadante de cerebro, más 100 μL de reactivo de Griess y 800 μL de agua destilada. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Biorad SmartSpect 3000 a 540 nm

La concentración NO_2^- de se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de nitrito de sodio (NaNO_2) con concentraciones de 0.5 a 10 μM (Anexo), la cual se determinó paralelamente en cada ensayo.

4.- Cuantificación de los niveles de Zinc (Johnson et al., 1977)

Los niveles de zinc fueron cuantificados por el método de Johnson [Johnson et al., 1977]. Este ensayo se basa en la utilización de una concentración óptima de clorhidrato de guanidina para causar la liberación de zinc de las proteínas, después se lleva a cabo un desenmascaramiento del complejo del zinc liberado con el cianuro. El complejo de cianuro-zinc es desenmascarado con hidrato de cloral, seguido de una reacción colorimétrica entre el zinc y el 4-(2-pyridylazo) resorcinol. Este complejo con zinc tiene una absorción máxima a 497 nm.

Para cuantificar zinc en las muestras se tomaron 100 µL de sobrenadante de la muestra, más 100 µL de agua desionizada, 1 mL de guanidina, 100µL de pyridylazo resorcinol, 50µL de hidrato de cloral, una vez que se colocaron los reactivos se mezclaron y esperó 5 minutos. Posteriormente, las muestras se leyeron a 497 nm en el espectrofotómetro Biorad SmartSpect 3000.

Resultados

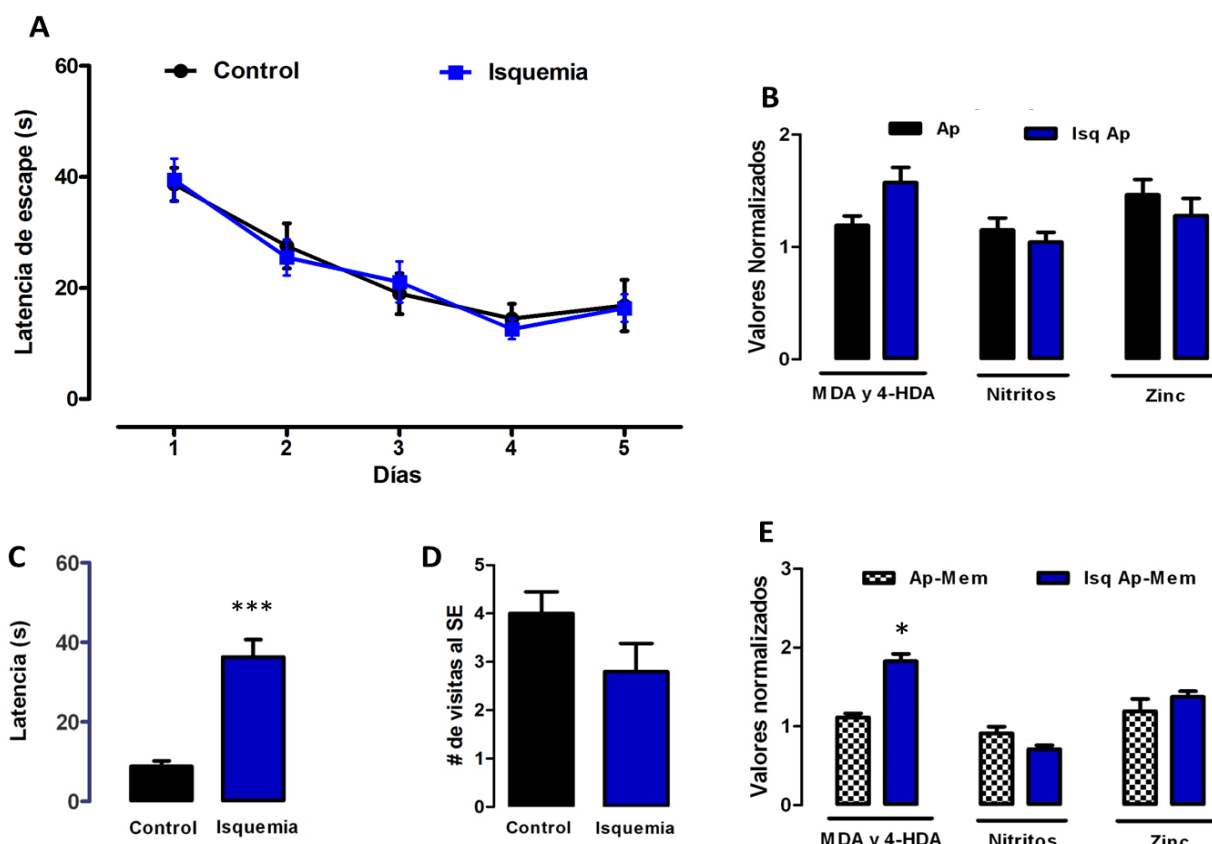


Figura 8. Efecto de la Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva sobre el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y los análisis cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria. El grupo Isquemia fue comparado contra el grupo Control, ambos grupos contaron con una $n=10$ para la evaluación de aprendizaje y $n=5$ para la evaluación de memoria. El grupo Isquemia fue sometido a la cirugía de la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) por 10 min, 24 h después se realizó el primer ensayo de Aprendizaje. Se llevaron a cabo 4 ensayos con duración no mayor a 60s cada uno, a lo largo de 5 días para desarrollar Aprendizaje, se muestran los valores promedio \pm SEM, valores analizados con ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni (A), mientras que evaluación de la memoria se realizó 7 días posteriores al último día de Aprendizaje que consistió en un solo ensayo (C) y (D). *** $p<0.0001$ valores estadísticamente significativos analizados con ANOVA de una vía post-test de Dunnet. En la figura (B) (Aprendizaje) y (E) (Memoria) se muestran los valores normalizados de MDA y 4-HDA (cuantificados por método colorimétrico de Gerard-Monnier et al., 1998) de Nitritos (cuantificados por el método colorimétrico de Chao et al., 1982) de Zinc (cuantificados con por el método colorimétrico de Johnson et al., 1977) a partir de sobrenadante de corteza temporo-parietal. Las barras muestran los valores promedio \pm SEM. * $p<0.05$. Diferencia estadísticamente significativa analizados con ANOVA 1 vía, post-test Dunnet.

Los resultados muestran que la OACP no produjo diferencias en el desempeño de las ratas durante la adquisición del aprendizaje, sin embargo sí afectó la consolidación de la memoria, mostrando un incremento de la latencia de escape de

36.3 ± 16.3s cuando se compara contra el grupo Control 8.8 ± 3.9s **C** y un aumento del número de visitas al cuadrante SE. En las figuras **(B)** y **(E)** se muestran los valores promedio ± SEM de los niveles de MDA y 4-HDA, Nitritos y Zinc. Al final de la evaluación de Aprendizaje los niveles de MDA y 4-HDA no muestran un incremento significativo, mientras que al final de la evaluación de la Memoria se observa un incremento de 82.6 ± 0.1%. Los niveles de Nitritos no muestran incrementos significativos en los tiempos evaluados así como los niveles de Zinc.

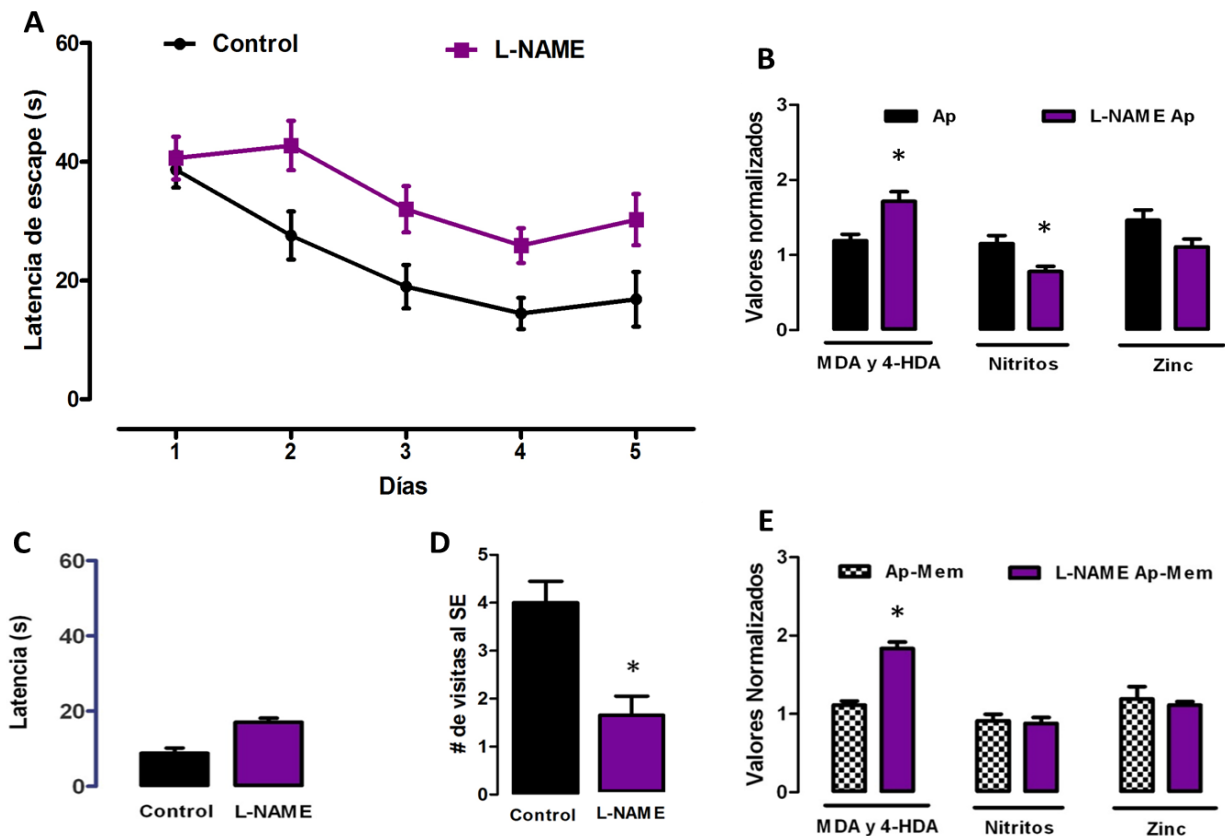


Figura 9. Efecto del NO sobre el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y los analitos cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria. El grupo L-NAME fue comparado contra el grupo Control, ambos grupos contaron con una $n=10$ para la evaluación de aprendizaje y $n=5$ para la evaluación de memoria. El grupo L-NAME fue administrado con el inhibidor inespecífico (10mg/kg) vía i.p., 25 h antes de realizarse el primer ensayo de aprendizaje. Se mantuvieron los parámetros de evaluación que en los grupos anteriores. Se muestran los valores promedio ± SEM, valores analizados con ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni **(A)** y la evaluación de la memoria se realizó 7 días después del último día de Aprendizaje valores analizados con ANOVA de una vía post-test de Dunnett **(C)** y **(D)**. En la figura **(B)** (Aprendizaje) y **(E)** (Memoria) se muestran los valores normalizados de MDA y 4-HDA (cuantificados por método colorimétrico de Gerard-Monnier et al., 1998) de Nitritos (cuantificados por el método colorimétrico de Chao et al., 1982) de Zinc (cuantificados con por el método colorimétrico de Johnson et al., 1977) a partir de sobrenadante de

*corteza temporo-parietal. Las barras muestran los valores promedio \pm SEM. * $p < 0.05$. Diferencia estadísticamente significativa analizados con ANOVA 1 vía, post-test Dunnet.*

El grupo que solo recibió la administración i.p. de L-NAME mostró una tendencia al aumento de la latencia de escape (día 1 $0.97 \pm 18.21s$, día 2 $16 \pm 19s$, día 3 $14.7 \pm 14.3s$, día 4 $11.6 \pm 11.6s$ y día 5 $18.3 \pm 13.6s$) durante la adquisición del aprendizaje **(A)** sin llegar a ser significativo cuando se comparó contra el grupo Control, de igual manera se muestra un incremento de $19.6 \pm 8.8s$ en la evaluación de la memoria **(C)** y una disminución del número de visitas al cuadrante SE. En las figuras **(B)** y **(E)** se muestran los valores promedio \pm SEM de los niveles de MDA y 4-HDA, Nitritos y Zinc. Los niveles de MDA y 4-HDA cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje **(B)** muestran un incremento de $71.5 \pm 0.13\%$ y al final de la evaluación de Memoria **(E)** de $83.5 \pm 0.1\%$. Los niveles de Nitritos muestran una disminución del $22.2 \pm 0.07\%$ **(B)** mientras que no se observan cambios en la evaluación de Memoria **(E)**. Los niveles de Zinc no mostraron cambios significativos en los tiempos de cuantificación, valores comparados respecto los niveles del grupo Control.

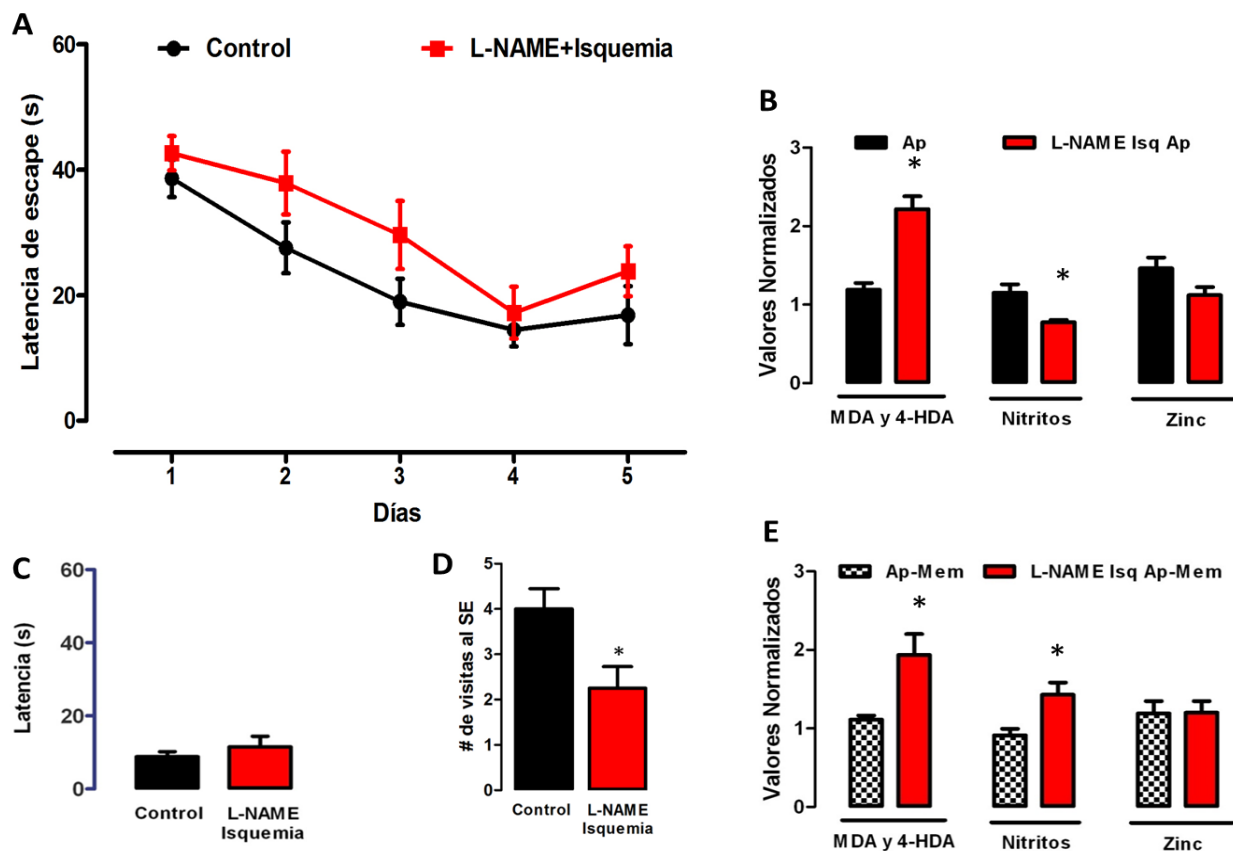


Figura 10. Efecto de la administración de L-NAME previo a la Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva sobre el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y los análisis cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria. El grupo L-NAME+ Isquemia fue comparado contra el grupo Control, ambos grupos contaron con una $n=10$ para llevar a cabo la evaluación de aprendizaje mientras que para la evaluación de la memoria cada grupo conto con $n=5$. El grupo L-NAME+Isquemia fue administrado con una dosis de L-NAME (10 mg/kg) vía i.p. 1 h antes de realizarse la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) por 10 min, 24 h después se realizó el primer ensayo de aprendizaje. Se mantuvieron los parámetros de evaluación que en los grupos anteriores. Se muestran los valores promedio \pm SEM, valores analizados con ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni (A) y la evaluación de la memoria se realizó 7 días después del último día de Aprendizaje valores analizados con ANOVA de una vía post-test de Dunnet (C) y (D). En la figura (B) (Aprendizaje) y (E) (Memoria) se muestran los valores normalizados de MDA y 4-HDA (cuantificados por método colorimétrico de Gerard-Monnier et al., 1998) de Nitritos (cuantificados por el método colorimétrico de Chao et al., 1982) de Zinc (cuantificados con por el método colorimétrico de Johnson et al., 1977) a partir de sobrenadante de corteza temporo-parietal. Las barras muestran los valores promedio \pm SEM. * $p<0.05$. Diferencia estadísticamente significativa analizados con ANOVA 1 vía, post-test Dunnet.

Quando se administró el L-NAME 1h antes de la OACP, el grupo no mostro diferencias en el análisis cuando se compara contra el grupo Control disminuyendo progresivamente los tiempos de latencia (día 1 $42.6 \pm 13.5s$, día 2 $37.9 \pm 12s$, día 3 $29.6 \pm 9.4s$, día 4 $17.2 \pm 5.4s$ y día 5 $23.8 \pm 7.5s$) (A), además se encontró que el inhibidor inespecífico de NOS previno la perdida de la memoria causada por la OACP (C),

causando un decremento de la latencia de escape de $11.5 \pm 5.8s$ y aumentando discretamente el número de visitas al cuadrante SE (D). En las figuras (B) y (E) se muestran los valores promedio \pm SEM de los niveles de MDA y 4-HDA, Nitritos y Zinc. Los niveles de MDA y 4-HDA cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje (B) muestran un incremento del $121.9 \pm 0.16\%$ y al final de la evaluación de Memoria (E) del $93.3 \pm 0.3\%$. Los niveles de Nitritos muestran una disminución del $22.4 \pm 0.03\%$ (B) mientras que en la evaluación de Memoria (E) se observa un aumento del $42.9 \pm 0.15\%$. Los niveles de Zinc no mostraron cambios significativos en los tiempos de cuantificación, valores comparados respecto los niveles del grupo Control.

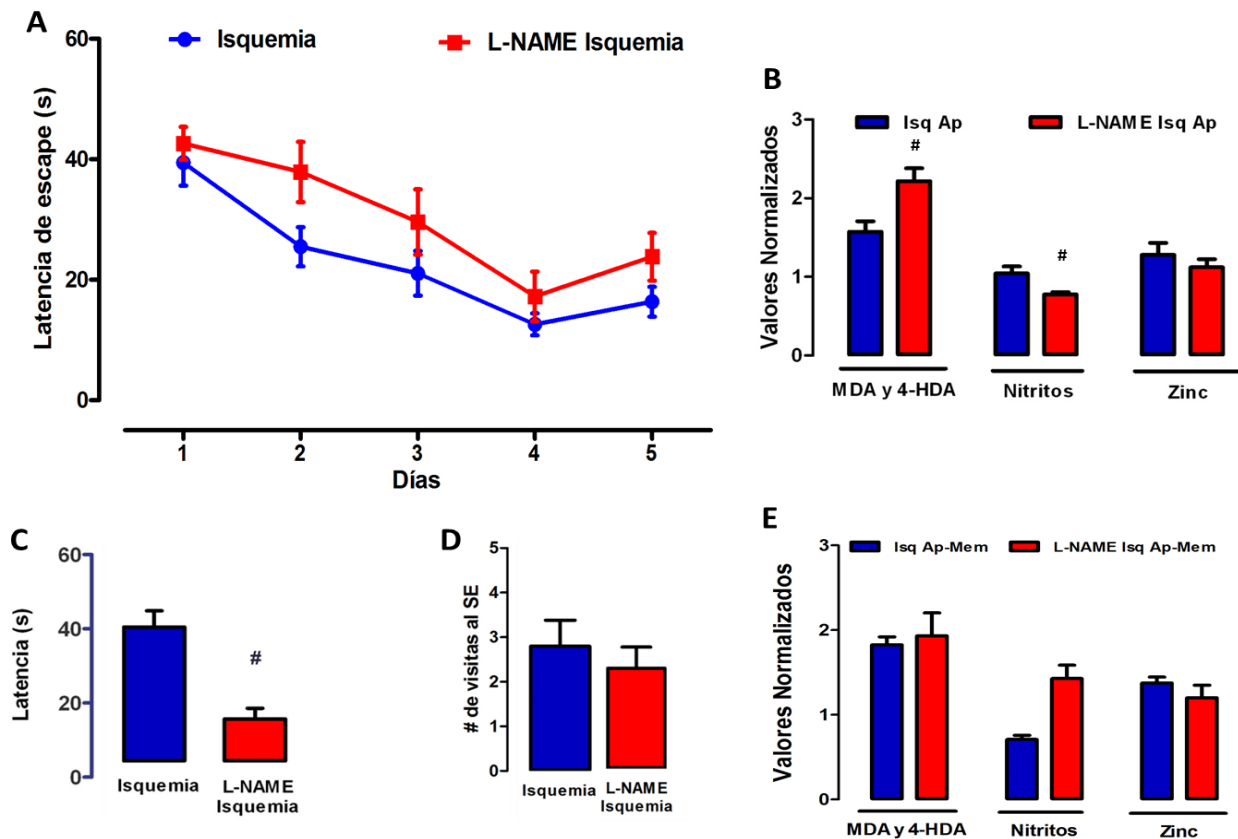


Figura 11. Efecto de la administración de L-NAME sobre la Obliteración de la Arteria Carótida Primitiva y el desempeño del Aprendizaje y la Memoria de ratas evaluadas en el Laberinto Acuático de Morris y los análisis cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje y Memoria. El grupo L-NAME+ Isquemia fue comparado contra el grupo Isquemia, ambos grupos contaron con una $n=10$ para llevar a cabo la evaluación de aprendizaje mientras que para la evaluación de la memoria cada grupo conto con $n=5$. El grupo Isquemia fue sometido a la cirugía de la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) por 10 min, 24 h después se realizó el primer ensayo de aprendizaje. Se mantuvieron los parámetros de evaluación que en los grupos anteriores. Se muestran los valores promedio \pm SEM, valores analizados con ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni (A). Se muestran los valores promedio \pm

*SEM, valores analizados con ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni (A) y la evaluación de la memoria se realizó 7 días después del último día de Aprendizaje valores analizados con ANOVA de una vía post-test de Dunnet (C) # $p < 0.0001$ valores estadísticamente significativos analizados con ANOVA de una vía post-test de Dunnet, # Isquemia vs L-NAME+Isquemia y visitas al cuadrante SE (D). En la figura (B) (Aprendizaje) y (E) (Memoria) se muestran los valores normalizados de MDA y 4-HDA (cuantificados por método colorimétrico de Gerard-Monnier et al., 1998) de Nitritos (cuantificados por el método colorimétrico de Chao et al., 1982) de Zinc (cuantificados con por el método colorimétrico de Johnson et al., 1977) a partir de sobrenadante de corteza temporo-parietal. Las barras muestran los valores promedio \pm SEM. * $p < 0.05$. Diferencia estadísticamente significativa analizados con ANOVA 1 vía, post-test Dunnet.*

El grupo L-NAME + Isquemia fue administrado con el inhibidor inespecífico una dosis de L-NAME (10 mg/kg) 1 h antes de llevarse a cabo la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) por 10 min, 24 h después se realizó el primer ensayo de aprendizaje. No se encontraron diferencias cuando se compara contra el grupo Control (A), pero se encontró que el L-NAME previno la pérdida de la memoria causada por la OACP (C), causando una disminución de la latencia del 24.8 ± 12.4 s respecto al grupo Isquemia. Se mantuvieron los parámetros de evaluación que en los grupos anteriores. Los niveles de MDA y 4-HDA cuantificados al final de la evaluación de Aprendizaje (B) muestran un incremento del $14.2 \pm 1.0\%$ y al final de la evaluación de Memoria no se observan cambios significativos (E). Los niveles de Nitritos muestran una disminución del 18% (B) mientras que en la evaluación de Memoria (E) se observa un aumento del 38.5%. Los niveles de Zinc no mostraron cambios significativos en los tiempos de cuantificación, valores comparados respecto los niveles del grupo Control.

Discusión de Resultados

El aprendizaje y la memoria son fenómenos neurológicos que están determinados por estímulos del medio ambiente hacia un sujeto. En el caso exclusivo del aprendizaje y la memoria espacial, el hipocampo y la corteza cerebral participan como un circuito para potencializar estos fenómenos **(Doze & Perez, 2012; Giese & Mizuno, 2013)**.

Investigaciones indican que el NO es participe en el desarrollo del aprendizaje y consolidación de la memoria pues activa vías de señalización que pueden amplificar o modular procesos como la neurogénesis, transmisión y plasticidad sináptica **(Harooni et al., 2009; Gallo e Iadecola, 2011; Giese & Mizuno, 2013; Moosavi et al., 2014)** modificando así la conducta de los sujetos de experimentación **(Pitsikas, 2014)**. El uso de inhibidores de la NOS confirma el papel pleotrópico que tiene el NO en el Aprendizaje y la Memoria **(Harooni et al., 2009; Gallo & Iadecola, 2011; Moosavi et al., 2014; Pitsikaz, 2014)**, en la figura 8 **(A)** se puede observar que la administración de L-NAME (10mg/kg) previa a un entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris, altera la conducta del Aprendizaje aumentando la latencia de escape a lo largo de la evaluación y respecto al desempeño del grupo Control. El perfil de analitos cuantificados muestra un aumento de los niveles de MDA y 4-HDA que podría propiciar un estado oxidativo celular **(Förstermann & Sessa et al., 2012; Adaramoye et al., 2012)** y que podría estar afectando el funcionamiento celular **(Li et al., 2010; Ayala et al., 2014)**. El efecto del L-NAME disminuye la presencia de NO y por ende de metabolitos secundarios del mismo, dígase de Nitritos **(Stevanovic et al., 2011)** y con ello los niveles del Zinc disminuyen pues existe un efecto retrogrado del NO para que la liberación de este biometal se lleve a cabo y la neuronas post-sinápticas puedan captar el Zinc liberado **(Frederickson et al., 2002; Aimo et al., 2010)**, resultados comparados contra el grupo Control (ver figura 9 B).

La conducta de Memoria evaluada 7 días después del último día de aprendizaje aún se ve afectada por la administración de L-NAME **(Moosavi et al., 2014; Pitsikaz, 2014)** (ver figura C y D) y confirmado con el perfil metabólico evaluado en las mismas

condiciones, los resultados muestran los niveles de MDA y 4-HDA aumentados, lo que probablemente indica que el daño celular persiste hasta el último día de evaluación (**Li et al., 2010; Ayala et al., 2014**). Los niveles de Nitritos no muestran variación, este mismo comportamiento se observa en los niveles de Zinc, fenómeno explicado arriba. Resultados comparados contra el grupo Control (ver figura 8 C y D).

Distintos modelos de daño cerebral han mostrado y confirmado que estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral son afectadas (**Morris et al., 1982; González-Barrios et al., 2002; Aguilar-Alonso et al., 2008**).

La OACP realizada por 10 min, es considerada como un daño cerebral sub-letal (**Kader, 1993**). Este daño no altera el desempeño del Aprendizaje en las ratas comparadas con el del grupo Control (ver figura 9 A). El perfil de analitos cuantificado al final de la evaluación muestra un aumento de los niveles de MDA y 4-HDA, sugiriendo que: 1.El entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris propicia un intercambio neuronal (neuronas viejas por nuevas) a lo largo de la evaluación que beneficia el Aprendizaje y que el metabolismo de las neuronas viejas influye en los niveles de MDA y 4-HDA (**Leuner & Gould, 2010; Taupin, 2006**), además que ROS como O_2^- y el H_2O_2 están involucradas en fenómenos como la proliferación y supervivencia celular que favorece el Aprendizaje y podría tener un impacto en el metabolismo del MDA y 4-HDA sin que este aumento signifique muerte celular (**Ayala et al., 2014**) en todos los grupos experimentales y 2. El daño isquémico persiste al final de la evaluación del Aprendizaje (**Samdami et al., 1997; Pacher et al., 2009; De Silva et al., 2013; Wu et al., 2014**) y no modifica la conducta de las ratas con OACP comparadas contra el grupo Control. Los niveles de Nitritos y Zinc disminuyeron, sugiriendo que la actividad del NO y el Zinc está relacionada e involucrada en la modulación de la actividad de los receptores NMDA y la actividad de la NOS (**Knott & Bossy-Wetzel, 2009; Garthwaite, 2008; Iadecola, 2011**) evitando que se perturbe la homeostasis celular (**Frederickson et al., 2002; Takeda, 2014**), resultados respecto al grupo Control (ver figura 9 B).

Sin embargo los resultados en el evaluación de la Memoria muestran que la OACP (10 min) afecto la consolidación del entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris, pues el grupo Isquemia muestra un aumento significativo en la latencia para

localizar el cuadrante SE (ver figura 9 C y D) indicando que: 1.El daño isquémico en la fase tardía a la evaluación afecta los niveles de MDA y 4-HDA (**Pacher et al., 2009; De Silva et al., 2013; Wu et al., 2014**) y 2.El daño isquémico se le ha adjudicado a la iNOS, el NO producido por la isoforma inducible podría ejercer un efecto citotóxico (**Byun et al., 2009; Pacher et al., 2009**) y aunque no se observa un aumento sustancial en los niveles de Nitritos, lo que podría deberse a disfunción y daño neuronal (**Pacher et al., 2009; Cechetti et al., 2012; Kalogeris et al., 2012**) que a su vez modifica el almacenamiento del Zinc en las neuronas (**Takeda et al., 2014**) resultados comparados respecto al grupo Control (ver figura 9 E).

Estudios han mostrado que la administración de L-NAME previa a un modelo de daño cerebral previene la presencia de marcadores de daño celular cuantificados en la fase temprana post-isquemia (**Seif-El-Nars & Fahim, 2000; Aguilar-Alonso et al., 2008; Awooda et al., 2013**) y en la fase tardía post-isquemia (4-7 días después) (**Gahm et al., 2005; Terpolilli et al., 2012**)

La administración de L-NAME (10 mg/kg) afecto la conducta de las ratas que fueron sometidas a la OACP, con lo que el desempeño de las ratas fue mejorando con forme los días de evaluación aumentaban (ver figura 10 A). El perfil de analitos cuantificados muestra un aumento en los niveles de MDA y 4-HDA al final de la evaluación de Aprendizaje (ver figura 10 B), este incremento no refleja daño celular alguno a nivel cerebral por lo que probablemente estos biomarcadores puedan participar de manera benéfica en procesos celular como la proliferación y supervivencia celular (**Ayala et al., 2014**) promoviendo la actividad neuronal. Por su parte, el efecto del L-NAME disminuyo los niveles de nitritos (**Stevanovic et al., 2011**) y con ello los niveles de Zinc se mantuvieron por debajo de los del grupo Control indicando una modulación en la actividad neuronal a través de procesos celulares (**Takeda et al., 2014**).

El desempeño de las ratas en la evaluación de Memoria, muestra que la administración de L-NAME previno la perdida de la función cognitiva reflejado a través de la disminución de la latencia para localizar el cuadrante SE y un discreto aumento en el promedio de visitas al mismo cuadrante (ver figura 10 C y D). Se mantiene un

incremento en los niveles de MDA y 4-HDA probablemente debido a que el entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris haya afectado positivamente procesos como la neurogénesis y plasticidad sináptica, con ello un intercambio neuronal se pudo llevar a cabo en desarrollo del Aprendizaje **(Leuner & Gould, 2010)**. Los niveles de Nitritos presentan un aumento, esto podría deberse a una síntesis de novo de Nitritos a partir de una fuente remota al cerebro y que el efecto inhibitorio del L-NAME no es capaz de detener **(Milsom et al., 2012)** que eleva ligeramente los niveles de Zinc cuantificados **(Takeda, 2014)** (ver figura 10 E) y con ello mantienen un conducta positiva hacia la consolidación de la información en la Memoria.

Diversos estudios indican que el L-NAME puede ser propuesto como un posible tratamiento que ayude a detener el daño posterior a un modelo de daño cerebral disminuyendo el volumen de infarto **(Margail et al., 1997; Mohammadi et al., 2011; Mohammadi et al., 2012)**, el impacto negativo del daño isquémico a estructuras cerebrales **(Caldwell et al., 1996; Buisson et al., 1992)**, la excitotoxicidad por daño celular **(Byun et al., 2009)** y el estrés oxidativo y nitrosativo **(Seif-EI-Nars & Fahim, 2000; Aguilar-Alonso et al., 2008; Awooda et al., 2013)** por lo menos en la fase temprana (menos de 36 h después del proceso obstructivo) del daño post-isquémico. Gahm et al **(2005)** muestra que la administración local de L-NAME posterior a un daño cerebral disminuye un marcador de daño (3-Nitrotirosina) y la actividad de las NOS 24 h después del daño y en la evaluación microscópica (TUNEL, degeneración y supervivencia Neuronal) muestra la presencia de células apoptóticas pero al mismo tiempo de células que se han adaptado a los cambios isquémicos, lo anterior indica que el L-NAME en condiciones isquémicas cerebrales podría proteger funciones neuronales importantes en la fase temprana y tardía post-isquemia aunado al entrenamiento en el LAM mejorando el aprendizaje y manteniendo la memoria. Por lo anterior el L-NAME podría prevenir un déficit neurológico provocado por el evento isquémico **(Awooda et al., 2013; Mohammadi et al., 2011)**.

El desempeño en el Laberinto Acuático de Morris del grupo Isquemia es muy similar al del grupo Control y las comparaciones con el grupo L-NAME+Isquemia podrían ser las mismas (ver figura 11 A). El perfil de analitos cuantificado en el día 5 del

aprendizaje muestra un aumento en los niveles de MDA y 4-HDA, probablemente esto indique que: 1. No todas las células que sufrieron isquemia se adaptaron a las condiciones post-isquémicas y de reperfusión y 2. En el curso temporal evaluado, en la fase final de la evaluación la inhibición de la iNOS podría dirigirse hacia la producción de O_2^- con lo que los biomarcadores de daño se ven afectados (**Byun et al., 2009; De Silva et al., 2013**) pero a pesar de mantener un incremento sobre el grupo Isquemia, estos no perjudican el Aprendizaje. Caso opuesto en los niveles de Nitritos pues hay un efecto inhibitorio (**Stevanovic et al., 2011**) y que esta disminución pueda tener un efecto modulador en los niveles de Zinc para evitar daño celular (**Frederickson et al., 2002; Takeda, 2014**) (ver figura 10 B).

En la evaluación de la Memoria el comportamiento que presentan las ratas del grupo L-NAME+Isquemia respecto a las del grupo Isquemia cambia (ver figura 10 C) , el parámetro de la latencia para localizar el cuadrante SE disminuye significativamente y el promedio de veces que navega en el cuadrante SE aun es diferente (ver figura 10 D), sin embargo el valor que pertenece al grupo Isquemia puede deberse a que al aumentar la latencia para localizar el cuadrante SE, las ratas del grupo Isquemia experimentaron una navegación errática y con ello desorientación, por ello la diferencia en parámetro previo (**Morris et al., 1982; Vicens et al., 2001**). La cuantificación de los analitos presenta niveles próximos de MDA y 4-HDA, sin que en el grupo L-NAME+Isquemia afecte la conducta y que el aumento de estos biomarcadores sugiere que intercambio celular se lleva a cabo de manera adecuada (**Leuner & Gould, 2010**). De la misma manera que cuando se comparan los niveles de Nitritos respecto al grupo Control, se observa un incremento que podría ser explicado de la misma manera y que en el grupo Control vs L-NAME+Isquemia (**Milsom et al., 2012**). Los niveles de Zinc muestran una ligera disminución, que no afecta la funcionalidad celular reflejada en la evaluación de Memoria (**Takeda, 2014**) (ver figura 11 E).

Conclusión

La presencia del óxido nítrico es crucial para el desarrollo del Aprendizaje y la Memoria, y su efecto protector podría ayudar a mantener funciones fisiológicas y cognitivas a largo plazo que se ven alteradas en condiciones isquémicas.

Bibliografía

Abel T. & Nguyen P.V. 2008. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Progress in Brain Research*. 97-115.

Adaramoye O.A., Nwosu I.O., & Farombi E.O. 2012. Sub-acute effect on N^G-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME) on biochemical indices in rats: Protective effects of Kolaviron and extract of *Curcuma longa L.* *Phcog Research*. 127-134.

Aguilar-Alonso P., Martínez-Fong D., Pazos-Salazar N.G., Brambila E., González-Barrios J.A., Mejorada A., Flores G., Perez-Peña L.M., Rubio H. & León-Chávez B.A. 2008. The increase in Zinc levels and upregulation on Zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat. *Brain Research*. 89-98.

Aimo L., Cherr G.N. & Oteiza P.I. 2010. Low Extracellular Zinc Increases Neuronal Oxidant Production Through NADPH Oxidase and Nitric Oxide Synthase Activation. *Free Radic Biol Med*. 1577–1587.

Akirav I. & Maroun M. 2007. The Role of the Medial Prefrontal Cortex-Amygdala Circuit in Stress Effects on the Extinction of Fear. *Neural Plasticity*. 1-55.

Alderton W.K., Cooper C.E. & Knowles R.G. 2001. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem. J*. 593-615.

Alexander S.P.H, Benson H.E., Faccenda E., Pawson A.J., Sharman J.L., Spedding M., Peters J.A., Harmor A.J. & CGTP Collaborators. 2013. The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: enzymes. *British Journal of Pharmacology*. 1797–1867.

Awooda H.A., Lutfi M.F., Sharara G.M. & Saeed A.M. 2013. Role of N-Nitro- L-Arginine Methylester as antioxidant in transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Experimental & Translational Stroke Medicine*. 1-6.

Ayala A., Muñoz M.F. & Argüelles S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-31.

Beltrán Galindo Omar. 2010. Efecto de la administración subaguda sobre la lipoperoxidación inducida por la obliteración de la arteria carótida primitiva en ratas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue.: Tesis de Licenciatura.

Blanco-Alvarez V.M. 2013. Efecto de la administración subaguda de zinc sobre la transcripción genética de quimiocinas, sus receptores y factores de crecimiento durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. Pue.: Tesis de Maestría.

Blanco-Alvarez V.M., Lopez-Moreno P., Soto-Rodriguez G., Martinez-Fong D., Rubio H., Gonzalez-Barrios J.A., Piña-Leyva C., Torres-Soto M., Gomez-Villalobos M.J., Hernandez-Baltazar D., Brambila E., Eguibar J.R., Ugarte A., Cebada J. & Leon-Chavez B.A. 2013. Subacute Zinc Administration and L-NAME Caused an Increase of NO, Zinc, Lipoperoxidation, and Caspase-3 during a Cerebral Hypoxia-Ischemia Process in the Rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-10.

Buisson A., Plotkine M. & Boulu R.G. 1992. The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. *British Journal Pharmacology*. 766–767.

- Busl K.M. & Greer D.M. 2010. Hypoxic-ischemic brain injury: Pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation*. 5-13.
- Byun J.S., Lee S.H., Jeon S.H., Kwon Y.S., Lee H.J., Kim S.S., Kim Y.M., Kim M.J. & Chun W. 2009. Kainic Acid-induced neuronal death is attenuated by aminogunidine but aggravated by L-NAME in mouse hippocampus. *Korean J. Physiol Pharmacol*. 265-271.
- Caldwell M., O'Neill M., Earley B. & Leornad B.E. 1996. N^G-Nitro- L-Arginine Methyl Ester protects against ischaemia-induced biochemical changes and hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *Human Psychopharmacology*. 299-307.
- Carnicer R., Crabtree M.J., Sivakumaran V., Casadei B. & Kass D.A. Nitric Oxide Synthases in Heart Failure. 2013. *Antioxidants & redox signaling*. 1078- 1099.
- Carrillo-Mora P., Giordano M. & Santamaría A. 2009. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*. 151–164.
- Cechetti F., Worm P.V., Lovatel G., Moysés F., Siqueira I.R. & Netto C.A. 2012. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sciences*. 29-36.
- Chao C.C, Hu S., Molitor T.W., Shaskan E.G., & Peterson P.K. 1992. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *Journal of Immunology*. 2736-4741.
- Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Maier C.M., Narasimhan P., Goeders C.E. & Chan P.H. 2011. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 1505-1517.
- Cormac T.T. & Moncada S. 2009. Nitric Oxide, Cytochrome C Oxidase, and the Cellular Response to Hypoxia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 643-647.
- Daff S. 2010. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*. 1-11.
- De Silva T.M., Brait V.H., Drummond G.R., Sobey C.G. & Miller A.A. 2011. Nox2 Oxidase Activity Accounts for the Oxidative Stress and Vasomotor Dysfunction in Mouse Cerebral Arteries following Ischemic Stroke. *PLoS ONE*. 1-9.
- Diccionario Médico. 5 de Diciembre de 2014. <http://www.diccionario-medico.com> (último acceso: 5 de Diciembre de 2015).
- Doze V.A. & Perez D.M. 2012. G-Protein-Coupled Receptors in Adult Neurogenesis. *Pharmacological Review*. 645-675.
- Erusalimsky J.D. & Mocanda S. 2007. Nitric Oxide and Mitochondrial Signaling From Physiology to Pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2524-2531.
- Flores-Soto M.E., Chaparro-Huerta V., Escoto-Delgadillo M., Vazquez-Valls E., González-Castañeda R.E. & Beas-Zarate C. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*. 1-11.
- Francis S.H., Busch J.L. & Corbin J.D. 2010. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews*. 525–563.

Frederickson C.J., Cuajungco M.P., Labuda C.J. & Shu W. Nitric oxide causes apparent release of zinc from presynaptic boutons. 2002. *Neuroscience*. 471-474.

Föstermann U. & Sessa W.C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 829-837.

Gahm C., Danilov A., Holmin S., Wiklund P.N., Brundin L. & Mathiesen T. 2005. Reduced neuronal injury after treatment with N^G-Nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME) or 2-Sulfo-Phenyl -N-Tert-Buthyl Nitron (SPBN) following experimental brain contusion.

Galasso S. L. & Dyck R.H. 2011. The role of zinc in cerebral ischemia. *Molecular Medicine*. 380-387.

Gallo E. F. & Iadecola C. 2011. Neuronal nitric oxide (NO) contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G (PKG), and ERK. *National Institute of Health*. 6947-6955.

Garthwaite J. 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal Neuroscience*. 2783-2802.

Gerard-Monnier D., Erdelmeier I., Régnard K., Moze-Henry N., Yadan J.C. & Chaudière J. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research Toxicology*. 1176-1183.

Ghasemi A. & Zahedial S. 2011. Is Nitric Oxide a Hormone?. *Iranian Biomedical Journal*. 59-65.

Giese K.P. & Mizumo K. 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & Memory*. 540-552.

González-Barríos J.A., Escalante B., Valdés J., León-Chávez B.A. & Martínez-Fong D. 2002. Nitric oxide and nitric oxide synthases in the fetal cerebral cortex of rats following transient uroplacental ischemia. *Brain Research*. 114-122.

Grandati M., Verrecchia C., Revaud M.L., Allix M., Boulu R.G. & Plotkine M. 1997. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *British Journal of Pharmacology*. 625-630.

Hall C.N. & Garthwaite J. 2009. What is the real physiological NO concentration in vivo?. *Nitric Oxide*. 92-103.

Hardingham N., Dachtler J. & Fox K. 2013. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers Cell Neuroscience*. 1-19.

Harooni H.E., Naghdi N., Sepehria H. & Rohania A.H. 2009. The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats. *Behavioural Brain Research*. 166-172.

Iadecola C., Timo Kahles T., Gallo E.F. & Anrather J. 2011. Neurovascular protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. *Journal Physiology*. 4137-4145.

National Institute Health (NIH). 2000. Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares. http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/accidente_cerebrovascular.htm#CVI (último acceso: 3 de Septiembre de 2014).

- Johnson D.J., Djuh Y.Y., Bruton J. & Williams H.L. 1977. Improved Colorimetric Determination of Serum Zinc. *Clinical Chemical*. 1321-1323.
- Kader A., Frazzini V.I., Solomon R.A. & Trifiletti R.R. 1993. Nitric Oxide Production During Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*. 1709-1715.
- Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M. & Korthuis R.J. 2012. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review Cell Molecular Biology*. 229–317.
- Kandel E. 2000. Neuronas y conducta En: *Principios de Neurociencia*. Kandel E., Schwarts H. & Jessel T. McGraw Hill-International. España. 19-35.
- Kandel E.R. 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain*. 5-14.
- Klipper E., Bashat D.B., Bornstein N.M., Shenhar-Tsarfaty S., Hallevi H., Auriel E., Shopin L., Bloch S., Berliner S., Giladi N., Goldbourt U. Shapira I., Korczyn A.D. & Assayag E.B. 2013. Cognitive Decline After Stroke Relation to Inflammatory Biomarkers and Hippocampal Volume. *Journal of the American Heart Association*. 1433-1435.
- Knott A.B. & Bossy-Wetzel E. 2009. Nitric Oxide in Health and Disease of the Nervous System. *Antioxidants & redox signaling*. 541-553.
- Knowles R.G. & Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemistry*. 249–258.
- Koh J.Y., Suh S.W., Gwaq B.J., He Y.Y., Hsu C.Y. y Choi D.W. 1996. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science*. 1013-1016.
- Kohman R.A. & Rhodes J.S. 2013. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, Immunity*. 1-25.
- Kopincová J., Púzserova A. & Bernátova I. 2011. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdisciplinary toxicology*. 63-68.
- Kopincová J., Púzserova A. & Bernátova I. 2012. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator?. *Pharmacological Reports*. 511-520.
- Leuner B. & Gould E. 2010. Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual Review of Psychology*. 1-35.
- Levenson C. W. 2014. Regulation of the NMDA receptor: Implications for neuropsychological development. *Nutrition Reviews*. 428-432.
- Li. C., Wang S., Cai Z., Liu W., Xi S., & Xiao P. 2012. Effets of intrahippocampal L-NAME treatment on the behavioral long-term potentiation in dentate gyrus. *Neuroscience Letters*. 201-204.
- Li H. & Poulos T.L. 2005. Structure-function on nitric oxide synthases. . *J. of Inorganic Biochemistry*. 293-305.
- Li Y., Hawkins B.E., DeWitt D.S., Prough D.S. & Maret W. 2010. The relationship between transient zinc ion fluctuations and redox signaling in the pathways of secondary cellular injury: relevance to traumatic brain injury. *Brain Research*. 131–141.

- Lipton P. 1999. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*. 1432-1568.
- Liu K., Yan M., Zheng X. & Yang Y. 2014. The Dynamic Detection of NO during the Ischemic Postconditioning against Global Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Nitric Oxide*. 1-28.
- Lozano A.R. & Soliz P.N. 2007. Indicadores de salud para el monitoreo de políticas públicas. VIII Encuentro Internacional de Estadísticas de Género para Políticas Públicas. Instituto de Nacional de Estadística y Geografía. 1-22.
- Margaill I., Allix M., Boulu R.G. & Plotkine M. 1997. Dose- and time-dependence of L-NAME neuroprotection in transient focal cerebral ischaemia in rats. *British Journal of Pharmacology*. 160-163.
- Markus H.S. 2004. Cerebral perfusion and stroke. *Journal of Neurological Neurosurgical Psychiatry*. 353-361.
- Massaad C.A. & Klann E. 2011. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013-2054.
- Matsumoto Y., Unoki S., Aonuma H. & Mizunami M. 2006. Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory. *Learning & Memory*. 35-44.
- Matsushita K., Kitagawa K., Matsuyama T., Ohtsuki T., Taguchi A., Mandai K., Mabuchi T., Yagita Y., Yanagihara T. & Matsumoto M. 1996. Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Research*. 362-365.
- Milsom A.B., Fernandez B.O., García-Saura M.F., Rodriguez J. & Feelisch M. 2012. Contributions of Nitric Oxide Synthases, Dietary Nitrite/Nitrate, and Other Sources to the Formation of NO Signaling Products. *Antioxidants & Redox Signaling*. 422-432.
- Mocanda S. & Bolaños J.P. 2006. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem*. 97: 1676-1689.
- Mohammadi M.T., Shid-Moosavi S.M. & Dehghani G.A. 2011. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. *Pathophysiology*. 13-20.
- Mohammadi M.T., Shid Moosavi S.M., & Dehghani G.A. 2012. Contribution of Nitric Oxide Synthase (NOS) Activity in Blood-Brain Barrier Disruption and Edema after Acute Ischemia/ Reperfusion in Aortic Coarctation-Induced Hypertensive Rats. *Iranian Biomedical Journal*. 22-30.
- Moosavi M., Abbasi L., Zarifkar A. & Rastegar K. 2014. The role of nitric oxide in spatial memory stages, hippocampal ERK and CaMKII phosphorylation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 164-172.
- Morris R.G., Garrud P., Rawlins J.N. & O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 681-683.
- Morris R.G. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 47-60.
- Mungrue I.N. & Bredt D.S. 2004. nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science*. 2627-2629.

OMS. 2014. Estadísticas Sanitarias Mundiales. Una mina de información sobre la Salud Pública. Organización Mundial de la Salud. 1-12.

Pacher P., Beckman J.S. & Liaudet L. 2009. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiology Review*. 315–424.

Pandya R.S., Mao L., Zhou H., Zhou S., Zeng J., Popp A.J., Wang X. 2011. Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 81-97.

Pannu R. & Singh I. 2006. Pharmacological strategies for regulation of inducible nitric oxide synthase: Neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochemistry International*. 170-182.

Paul V. & Ekambram P. 2011. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *The Indian Journal of Medical Research*. 471-478.

Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. 2014. *Behavioural Brain Research*. 1-8.

Powers W.J. & Zazulia A.R. 2011. PET in Cerebrovascular Disease. *PET clinics*. 1-37.

Rousseau D.L., Li D., Couture M. & Yeh S. 2005. Ligand-protein interactions in nitric oxide. *J. of Inorganic Biochemistry*. 306-323.

Ruiz-Sandoval J.L., Chiquete E., Bañuelos-Becerra L.J., Torres-Anguiano C., González-Padilla C., Arauz A., León-Jiménez C., Murillo-Bonilla L.M., Villarreal-Careaga J., Barinagarrementeria F. & Cantú-Brito C. 2012. Cerebral Venous Thrombosis in a Mexican Multicenter Registry of Acute Cerebrovascular Disease: The RENAMEVASC Study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 395-400.

Samdani A.F., Dawson T.M. & Dawson V.L. 1997. Nitric Oxide Synthase in Models of Focal Ischemia. *Stroke*. 1283-1288.

Sedmak J.J., & Grossberg S.E. 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal Biochemistry*. 544-552.

Seif-EI-Nars M. & Fahim A.T. 2000. Antioxidant effect of N^ω-Nitro- L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) on global cerebral ischemia in a rat model. *Arzneim.-Forsch./Drug Res*. 628-632.

Shuttleworth C.W. & Weiss J.H. 2011. Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia. *Trends Pharmacology Science*. 480-486.

Sies H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 180–183.

Soneja A., Drews M. & Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*. 108-119.

Stevanović I.D., Jovanović M.D., Čolić M., Jelenković A., Bokonjić D., Ninković M., Stojanović I. 2011. N-nitro-L-arginine methyl ester influence on aluminium toxicity in the brain. *Folia Neuropatologica*. 219-229.

Swcatt J.D. 2003. *Studies of Human Learning and Memory in: Mechanisms of Memory*. Swcatt J.D. Elsevier. Sn. Diego, California. 28-31.

- Takeda A. Significance of Zn²⁺ signaling in cognition: Insight from synaptic Zn²⁺ dyshomeostasis. 2014. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 393-396.
- Talarowska M., Gałecki P., Maes M., Bobińska K. & Kowalczyk E. 2012. Total Antioxidant Status Correlates with Cognitive Impairment in Patients with Recurrent Depressive Disorder. *Neurochemical Research*. 1761-1767.
- Taupin P. 2006. Adult neurogenesis and neuroplasticity. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 9-15.
- Terpolilli N.A., Moskowitz M.A. & Plesnila N. 2012. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1332–1346.
- Vicens P., Redolat R. & Carrasco M.C. 2003. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*. 539-544.
- Violi F., Marino R., Milite M.T. & Loffredo L. 1999. Nitric Oxide and its role in Lipid Peroxidation. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 283-288.
- Vítecek J., Lojek A., Valacchi G., & Kubala L. 2013. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. *Mediators of Inflammation*. 1-22.
- Waltereit R. & Weller M. 2003. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology*. 99-106.
- Wang H. & Leigh J. 2006. Effects of nitric oxide synthase inhibitor ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester, on silica-induced inflammatory reaction and apoptosis. *Particle and Fibre Toxicology*. 1-9.
- Warner D.S., Sheng H. & Batinic-Haberle I. 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *The Journal of Experimental Biology*. 3221-3231.
- Wei G., Dawson V. L. & Zweier J. L. 1999. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta*. 23-34.
- White N. 2008. Multiple memory systems in the brain: cooperation and competition. *Consciousness and Cognition*. 27-64.
- Woodruff T.M., Thundyil J., Tang S.C., Sobey C.G., Taylor S.M. & Arumugam T.V. 2011. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*. 6-11.
- Wu L., Zhang K, Hu G., Yan H., Xie C. & Wu X. 2014. Inflammatory response and neuronal necrosis in rats with cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*. 1753–1762.

Anexos

Técnica para la cuantificación de proteínas totales por el método de Commassie

Reactivo de Commassie

Preparar 210 mL de solución de ácido perclórico del 70% al 3%. Pesar 0.12g de Commassie Blue G-250 y disolver a agitación constante en la solución de ácido perclórico al 3%. Filtrar la solución de ácido perclórico al 3% y Commassie Blue G-250. Leer en el espectrofotómetro la solución filtrada a 465nm y utilizar como blanco solución de ácido perclórico 3% y ajustar (agregando más solución de ácido perclórico 3% o más Commassie blue G-250) hasta obtener una absorbancia entre 1.3 a 1.5. El reactivo de Commassie se debe mantener protegido de la luz, colocándolo en un frasco ámbar.

Para realizar la cuantificación de proteínas totales, se debe realizar una curva de calibración, y leer en el espectrofotómetro a 620nm

Concentración μM	Stock de Alb μL	H ₂ O destilada μL	Reactivo de Commassie
Blanco	0	500	500
1.0	1.0	499	500
2.5	2.5	497.5	500
5.0	5.0	495	500
10.0	10.0	490	500

Nota:

- Una vez que se ha agregado el reactivo de Commassie, la reacción es estable por 15 minutos, por lo que es recomendable que las muestras sean leídas lo más pronto posible.

Técnica para la cuantificación de Nitritos por el método de Griess

Stock de nitritos

Solución 1mM de nitrito de sodio (NaNO_2)

En un tubo Eppendorf pesar 0.069g de NaNO_2 , diluirlos en 1 mL agua destilada y mezclar perfectamente.

Solución 1 μM de nitrito de sodio (NaNO_2)

En un tubo Eppendorf colocar 999 μL de agua destilada, con ayuda de una micropipeta medir 1 μL de Solución 1mM de nitrito de sodio (NaNO_2) y mezclar perfectamente

Reactivo de Griess (Solución A+ Solución B)

Solución A

Pesar 1.32g de sulfanilamida

Medir 60mL de ácido acético glacial

Medir 39 mL de agua destilada

Mezclar perfectamente y almacenar en un frasco color ámbar a 4°C (Volumen final de la Solución A=100mL)

Solución B

Pesar 0.1g de N-1-naftil-etilendiamina. Medir 100 mL de agua destilada

Mezclar perfectamente y almacenar en un frasco color ámbar a 4°C (Volumen final de la solución B=100 mL)

Concentración μM	Stock de NaNO_2 μL	Agua destilada μL	Reactivo de Griess	H_2O destilada μL
Blanco	0	100	100	800
1.0	1.0	99	100	800
2.5	2.5	97.5	100	800
5.0	5.0	95	100	800
10.0	10.0	90	100	800

Notas:

- Las soluciones se mezclan en el momento en que se realice las determinaciones evitando así que el Reactivo de Griess entre en contacto con la luz
- El reactivo de Griess se prepara en proporción 1:1 de la solución A y la solución B
- El blanco de la solución no debe dar coloración, de suceder esto, cambiar el agua destilada o revisar que los tubos en los que se realizó la curva que no estén sucios
- Para realizar las cuantificaciones se debe realizar una curva de calibración que se lee en un espectrofotómetro a 540nm

Técnica para determinar MDA y 4-HDA por el método de Gerard-Monnier

Stock 10 μ M de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Solución II)

En un tubo ependorf disolver 1.65 μ L de 1,1,3,3-tetrametoxipropano en 1 mL de agua destilada y mezclar perfectamente

Solución 0.1 μ M de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Solución II diluida)

En un tubo ependorf diluir 50 μ L de la solución 10 μ M de 1,1,3,3-tetrametoxipropano con 4.5 mL de agua destilada y mezclar perfectamente

Solución de N-metil-2-fenilindol (Solución I)

Pesar 38mg de N-metil-2-fenilindol

Disolver el N-metil-2-fenilindol en 18mL de acetonitrilo, mezclar perfectamente

Al momento de emplear la solución de N-metil-2-fenilindol debe adicionarse 6 mL de metanol para alcanzar un volumen final de 24mL

Concentración (μ M)	Solución I μ L	Solución II (diluida) μ L	Ác. Metanosulfónico μ L	H ₂ O Destilada μ L
Blanco	650	0	150	200
0.5	650	5	150	195
1.0	650	10	150	190
2.5	650	25	150	175
5.0	650	50	150	150

Notas:

- Los tubos en lo que se lleva a cabo la reacción deben ser cubiertos con parafilm para después incubar a 45°C durante 1h
- En caso de que los tubos tengan mucho sobrenadante, estos se centrifugan durante 15 minutos a 3000 rpm y leer en un espectrofotómetro a 586nm

Técnica para determinar Zinc por el método de Johnson

Stock de Zinc

Disolver 1 g de óxido de Zinc (ZnO) en 1mL de agua desionizada, a partir de esta solución preparar varias diluciones hasta obtener una solución a una concentración de 0.1µg/mL

Solución de Guanidina 6M

Disolver 6M de guanidina en 1L de TRIZMA BASE 0.2M, el cual contiene 0.15% de NaCN y 0.35% de ácido ascórbico

Solución de 4-(2-piridazol)-resorcinol

Disolver 1g de 4-(2-piridazol)-resorcinol en 1L de agua desionizada. Proteger de la luz y mantener almacenado en refrigeración

Solución de Hidrato de cloral

Disolver 600 g de hidrato de cloral en 1L de agua desionizada

Concentración (µM)	H ₂ O Desionizada µL	Stock de Zinc µL	Guanidina 6M µL	Piridilazo resorcinol µL	Hidrato de cloral µL
Blanco	200.0	0	1000	100	50
0.5	199.5	0.5	1000	100	50
1.0	199.0	1.0	1000	100	50
2.5	197.5	2.5	1000	100	50
5.0	195.0	5.0	1000	100	50
10.0	190.0	10.0	1000	100	50

Notas:

- Todos los reactivos se preparan con agua desionizada
- Preparar todas las soluciones el mismo día de la determinación
- Utilizar tubos que hayan sido desionizados
- Una vez que se colocaron todos los reactivos y se agitaron, se espera 5 minutos. La curva de calibración se lee en un espectrofotómetro a 497nm

Parte de este trabajo fue publicado y presentado como cartel en los siguientes congresos

8ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica

Trabajo No. 114

La inhibición de óxido nítrico revierte el déficit de la memoria después de un proceso transitorio de hipoxia-isquemia cerebral en la rata.

¹Aguilar-Peralta A.K, ¹Toxqui-Xiqui, V., ¹González Vázquez, A., ¹Medina Carrera, J., ¹Blanco-Álvarez V., ¹Gonzalez-Camacho, E.B., ¹Piña-Leyva, C. ¹Soto-Rodríguez, G., ²Martínez-Fong, D., ³González-Barrios, JA, ⁴Ugarte A., ¹Torres y Soto, M., ¹León-Chávez, B.A.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ²Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, ³Laboratorio de Genómica, Hospital 1º de Octubre, ISSSTE, ⁴Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. bertha.leon@correo.buap.mx

8ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica Puebla, Pue. 2011



Inhibición del óxido nítrico previene la lipoperoxidación y pérdida de procesos cognitivos durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata.

González Vázquez A., Aguilar Peralta AK, Toxqui Xiqui V, Medina Carrera J, Soto-Rodríguez G, Piña-Leyva C, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León D, González-Barrios JA, León-Chávez BA.



Administración subaguda de zinc disminuye el estrés nitrosativo manteniendo el aprendizaje y memoria durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en ratas

Aguilar Peralta AK, Toxqui-Xiqui V, Piña-Leyva C, Blanco-Álvarez VM, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León DI, González-Barrios JA, González-Vázquez A., Medina Carrera J, León-Chávez BA.



LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas SMCF Tlaxcala, Tlax. 2013



Administración subaguda de zinc y L-NAME antes de hipoxia-isquemia cerebral incrementó la lipoperoxidación

Alejandro González Vázquez, Víctor Manuel Blanco-Álvarez, Daniel Limón Pérez de León, Daniel Martínez-Fong, Juan Antonio González Barrios, Bertha Alicia León-Chávez.

LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas SMCF Oaxaca, Oax. 2014



Óxido Nítrico influye en el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata

González Vázquez A., Aguilar Peralta AK, Piña-Leyva C, Martínez-Fong D, Limón Pérez de León, León-Chávez BA.



Efecto de la administración subaguda de zinc sobre el estrés nitrosativo, el aprendizaje y la memoria tras un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata

Aguilar Peralta AK, González-Vázquez A., Martínez-Fong D, Limón Perez de León DI, León-Chávez BA.



Semana del cerebro Facultad de Cs. Químicas, BUAP. Puebla, Pue. 2014



Incremento de la lipoperoxidación y alteración en la memoria de rata macho infantil después de una administración crónica de Zinc

Salma Trinidad Ruíz Pastrana, José Antonio Benavides Paredes, Víctor Manuel Blanco Álvarez, Alejandro González Vázquez, Daniel I. Limón, Eduardo Brambila y Bertha Alicia León Chávez

XII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. León, Gto. 2015

Neural Plasticity Impact Factor 3.608

About this Journal | Submit a Manuscript | Table of Contents

Journal Menu

- About this Journal
- Abstracting and Indexing
- Advance Access
- Aims and Scope
- Article Processing Charges
- Articles in Press
- Author Guidelines
- Bibliographic Information
- Citations to this Journal
- Contact Information

Research Article Provisional PDF

Prophylactic Subacute Administration of Zinc Increases CCL2, CCR2, FGF2 and IGF-1 Expression and Prevents the Long-Term Memory Loss in a Rat Model of Cerebral Hypoxia-Ischemia

Victor Manuel Blanco-Alvarez, Guadalupe Soto-Rodriguez, Juan A. Gonzalez-Barrios, Daniel Martinez-Fong, Eduardo Brambila, Maricela Torres-Soto, Ana Karina Aguilar-Peralta, Alejandro Gonzalez-Vazquez, Constantino Tomas-Sanchez, Ilhuicamina Daniel Limon, Jose Ramon Eguibar, Araceli Ugarte, Jeanett Hernandez-Castillo, and Bertha Alicia Leon-Chavez

Received 6 February 2015; Revised 30 May 2015; Accepted 1 June 2015

Academic Editor: Preston E. Garraghty