

**VALORACIÓN DE LOS CAMBIOS CELULARES EXOFOCALES DE LA METFORMINA
SUMINISTRADA CRÓNICAMENTE EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL
FOCAL TRANSITORIO EN RATAS**

Trabajo de Grado para optar al título de Maestría en Biociencias

Presentado por:

Isaac Arbeláez Quintero MD

Director

Mauricio Palacios MD, MSc, PhD, Profesor Asociado Univalle

FACULTAD DE SALUD

UNIVERSIDAD DEL VALLE

Santiago de Cali, 2017



Tabla de contenido

1. LISTADO DE FIGURAS	6
2. Antecedentes del grupo de investigación	14
3. Resumen	15
3.1 Abstract.....	16
4. Introducción	18
5. Marco teórico	20
5.1. Definición, historia y aspectos epidemiológicos de los accidentes cerebrovasculares.....	20
5.2. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal	21
5.3. Metformina como candidato a neuroprotector.....	23
5.4. Generalidades farmacológicas de la metformina	25
5.4.1. Historia y mecanismo de acción	25
5.4.2. Propiedades Químicas y Farmacocinética de Metformina.....	26
5.4.3. Estado actual de los estudios que han evaluado el papel neuroprotector de metformina en la isquemia cerebral	28
5.4.4. Papel de la AMPK como efector de Metformina.	29
5.4.5. Acciones vasoprotectoras de la Metformina en la isquemia cerebral en ratas	31
5.4.6. Acción de la Metformina en la inhibición de la apoptosis neuronal secundaria a la isquemia cerebral.....	32
5.5. Modelo de isquemia cerebral focal y cambios exofocales secundarios	33
5.6. Biomarcadores	35
5.6.1. Parvoalbúmina	35
5.6.2. MAP2	36
5.6.3. GFAP	37
5.6.4. NeuN	37

6. Justificación	40
7. Hipótesis de trabajo.....	42
8. Objetivos	43
8.1. Objetivo general.....	43
8.2. Objetivos específicos.....	43
9. Materiales y métodos	44
9.1. Modelo animal	44
9.2. Modelo de lesión, Isquemia focal con reperusión a los 90 minutos.	45
9.3. Anestesia durante procedimiento y analgesia en el posoperatorio.....	45
9.4. Suministro de metformina en Solución estéril al 6%	47
9.5. Dosis y administración de metformina.....	47
9.6. Isquemia cerebral con oclusión de la arteria cerebral media derecha	48
9.7. Obtención de los tejidos para el análisis	53
9.8. Perfusión y conservación del tejido cerebral.....	54
9.9. Estimación de la proporción del área infartada con el uso de TTC	54
9.10. Uso de criostato para obtención de tejidos	55
9.11. Inmunohistoquímica	56
9.12. Evaluación comportamental de los biomodelos	56
10. Análisis estadístico.....	60
10.1. Diseño experimental y validación de supuestos	60
10.2. ANOVA para Parvoalbúmina.....	61
10.3. Anova conteo neuronas con NeuN, Estriado.....	62
11. RESULTADOS.....	64
11.1. Valoración del Tamaño del Infarto. Uso de TTC.....	64
11.2. Resultados cualitativos.....	66
11.3. Valoración cualitativa de las dendritas de láminas de corteza cerebral motora. Uso de MAP2	66

11.4. Hiperreactividad glial. Uso del marcador GFAP	70
11.5. NeuN	73
11.5.1. Corteza cerebral, lámina II/III	73
11.5.2. Corteza cerebral, lámina V-VI	76
11.5.3. Estriado.....	76
11.6. Parvoalbúmina	77
11.7. Resultados pruebas de neurológicas.....	81
11.8. Pruebas Neurológicas Bederson y García	81
11.9. Pruebas Motoras	82
12. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	84
13. CONCLUSIONES	92
14. Anexos	93
14.1. Anexo 1. Escalas De Valoración Neurológica de Bederson y García.....	93
14.2. Anexo 2. Escala de valoración cualitativa del “Beam Walking Test”	94
14.3. Anexo 3. Resultados de cortes coronales en la corteza motora de acuerdo a la clasificación del atlas de Paxinos.....	95
14.4. Anexo 4. Resultados de escalas neurológicas Bederson y Garcia. GM72: Grupo Metformina post; GM: Grupo Metformina; SSN: Grupo Solución Salina	96
14.5. Anexo 5. Tabla con los resultados de los grupos en la prueba motora de balance (Beam Walking Test).....	97
14.6. Anexo 6. Resultados de las variables de seguimiento a los biomodelos durante la cirugía.....	98
14.7. Anexo 7. Análisis Estadístico	99
14.7.1. ANOVA Parvoalbúmina; Estadística ESTRIADO	99
14.7.2. Anova. NeuN, Estriado	101
14.8. Anexo 8. Aval Comité de ética animal	103
15. Referencias Bibliográficas	104

1. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Simplificación de los mecanismos fisiopatológicos en la isquemia cerebral focal. Tomado de A. Kuntz et al. / *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 24 (2010). 21

Figura 2. Seguimiento por 4 años a pacientes con diabetes con reducción de casi el 50% de episodios de Stroke en el grupo de pacientes que usan Metformina y Tomado de: Cheng Y. et al. Stroke and Cerebrovascular Diseases. vol: 23 (2). 2014 24

Figura 3. Diferentes vías celulares descritas para la acciones de la Metformina. La glucogénesis es inhibida por cambios en la expresión de genes específicos (igual para lipogénesis), inhibición de FBPasa y cambios en los cocientes de ATP/AMP, G3P/DHAP y lactato/piruvato. En las neuronas, AMPK puede tener diferentes acciones ya que estas no tienen las enzimas glucolíticas y por esto tienen capacidad reducida de almacenar nutrientes y responder a los déficit energéticos con alto riesgo de acidosis láctica. El receptor GABA_B está involucrado en los efectos neuroprotectores de la Metformina a través de la hiperpolarización secundaria a la liberación de K⁺ y la inhibición de entrada de calcio. OCT: Transportador catiónico orgánico. GP3: Glicerol-3-fosfato. mDFG: deshidrogenasa glicerofosfato mitocondrial. DHAP: dihidroxicetona fosfato. eNOS: sintasa endotelial de óxido nítrico. ON: óxido nítrico. aPKC: proteína cinasa C atípica. CBP: Proteína de unión al CREB. NF-KB: Factor nuclear kappa beta. TNFa: Factor de necrosis tumoral alfa. FBPasa: Fructosa 1,6 bifosfatasa. ACC: acetilCoA Carboxilasa. CaMKK: cinasa beta dependiente de calmodulina. mTOR: objetivo de rapamicina en células de mamíferos. Los demás efectos observados con la Metformina como la mayor sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina con el ejercicio, mayor captura de glucosa y disminución del perímetro abdominal pueden ser secundarios a la activación indirecta de LKB1 (la cual activa AMPK) en las células con una disminución de los niveles citoplasmáticos de ATP (27,28). Tomado de Arbeláez I, 2017 (31) 27

Figura 4. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata a nivel de la corteza motora dorsolateral, anterior a la unión de la comisura blanca. En lado izquierdo, la zona lateral oscura delimita el núcleo isquémico, la zona con gris claro denota la penumbra

isquémica en la corteza motora donde pueden persistir neuronas viables. Las regiones exofocales ipsilaterales y contralaterales de la corteza están en cuadrado con representación de las conexiones corticocorticales y corticoestriatales. Las neuronas de las láminas II/III hacen sinapsis corticocorticales con las neuronas ubicadas en estas láminas supragranulares del lado contralateral. Las proyecciones corticoestriatales se realizan desde neuronas piramidales de la lámina V. 35

Figura 5. Diseño experimental y uso de biomodelos. *IHQ: animales para análisis histológico mediante inmunohistoquímica. TTC: animales destinados para la cuantificación del infarto mediante la marcación con TTC. Sham: animales en los que se llevará a cabo el procedimiento quirúrgico requerido para la isquemia, pero no se realizará la obstrucción de la arteria cerebral media..... 44*

Figura 6. Equipo de anestesia utilizado. *Se observa el vaporizador, la máquina de anestesia, la cámara de inducción y el filtro que captura las moléculas aisladas de isofluorano. 46*

Figura 7. Forma farmacéutica utilizada de Metformina. *Viales de 20 mL que contienen metformina fabricados por Tecnoquímicas S.A. a una concentración de 6% (6g/100mL), estéril, con vidrio color ambór para proteger de la luz al principio activo. Estos viales se guardaron en nevera a 4 °C antes y durante su suministro a los grupos experimentales..... 47*

Figura 8. Técnica de Gavaje. *En esta gráfica se observa el modo de inmovilizar la rata en supino desde la cabeza y se pasa suavemente y con rapidez la canula por el esófago. Este procedimiento demora menos de 10 segundos. No hubo complicaciones durante su realización. 48*

Figura 9. Quirófano utilizado para la realización de inducción de isquemia cerebral. *Se utilizó microscopio estereotáxico, material quirúrgico para microcirugía, una lámpara de calor radiante para mantener eutérmicas las ratas durante el procedimiento. Estos procedimientos se realizaron en el quirófano de práctica quirúrgica de la Universidad del Valle y contaron con el aval del comité de ética animal de la Universidad del Valle..... 49*

Figura 10. Plano muscular para acceder a la arteria carótida. Esquema del abordaje quirúrgico de la arteria carótida común y su bifurcación en carótida interna y externa.

La incisión quirúrgica se practicaba a 1 mm de la línea mediana en el cuello. El tejido glandular se disecaba con cuidado y se mantenía dentro de la herida quirúrgica para evitar su desecación y necrosis. Se describen los tres músculos del trigono muscular que permite encontrar el acceso a la bifurcación de la carótida común. Sólo una rata se encontró con una anatomía vascular diferente a la reportada. (*, arteria carótida común). 1. Músculo Digástrico (se reconoce por una porción de su fascia que es brillante). 2. Músculo esternohiideo. 3. Músculo Esternomastoideo. 50

Figura 11. Ramas de la arteria carótida interna y sitio de introducción del monofilamento hasta el origen de la arteria cerebral media. Una vez se disea la arteria carótida externa, se introduce el monofilamento y se asciende hasta el origen de la ACM y se fija con un nudo en el muñon de la carótida externa. ECA: Arteria carótida externa. PPA: Arteria pterigopalatina. ICA: Arteria Carótida interna. PCOM: Arteria comunicante posterior. AchA: Arteria corioidea anterior. MCA: Arteria cerebral media. ACA: Arteria cerebral anterior. 51

Figura 12. Representación esquemática de inserción del monofilamento dentro de la arteria carótida externa (ECA). Tomado de Longa et al, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, Stroke, 1989;20:84-91..... 52

Figura 13. Línea del tiempo de los procedimientos realizados. El día cero comenzaba cuando las ratas llegaban a un peso entre 230 a 250 g. Tres días antes de la isquemia cerebral se comenzaba el entrenamiento en la prueba de balance en la barra. Esta prueba fue filmada 24 horas antes (día 16) y 72 horas después (día 20) de la isquemia cerebral. El día 16, 18 (a las 24 horas de la inducción de la isquemia cerebral) y 20 se realizaba una evaluación neurológica..... 53

Figura 14. Prueba del Beam Walking Test. La rata pasa de un extremo hostil (iluminado e incómodo) hasta un espacio-refugio oscuro con comida al pasar por una barra de un metro de largo que le exige mantener el equilibrio/balance. La gráfica no está a escala y muestra una barra más ancha de la utilizada (ancho real de la barra es de un cm)..... 57

Figura 15. Imagen de la corteza motora marcada con NeuN y con la señalización del área donde se realizaron los conteos neuronales. Los cuadrantes en verde se ajustaron

para un área de 250 x 250 micras donde se realizaron los conteos de neuronas entre los diferentes grupos en las láminas II/III y V/VI de la corteza cerebral motora. Idénticos cuadrantes se utilizaron para conteo en el estriado. A la derecha, en números romanos se describen las láminas de la corteza cerebral. Foto 10x..... 59

Figura 16. Tinción de cortes coronales de cerebro isquémico de rata Wistar con TTC. Cada corte coronal tiene un grosor aproximado de 2 mm, obtenidos 24 horas posterior a la inducción de la isquemia del territorio de la arteria cerebral media. Estos cortes se dejaron en TTC al 0,5% por 15 min a 37 °C. La región pálida señala las áreas isquémicas en el hemisferio derecho para cada grupo. **A.** Grupo Metformina Post. **B.** Grupo Solución Salina. **C.** Grupo Metformina Pre..... 64

Figura 17. Corte coronal de la corteza motora cerebral contralateral a la lesión isquémica, con inmunohistoquímica para MAP2, Grupo Sham. Se observan las dendritas apicales entre las láminas II a V (flecha negra) y algunos somas marcados (flecha roja) de neuronas ubicadas entre láminas IV a VI, sin deformidad ni alteraciones, con una intensidad media. Foto 10x..... 67

Figura 18. Fotografía microfilamentos contenidos en dendritas corteza cerebral con el uso de marcador MAP2 con diferente intensidad. **A.** Se observa microfilamentos de dendritas apicales en la corteza cerebral de la rata Sham con patrón de Intensidad alta y buena integridad de los microfilamentos contenidos en las dendritas de neuronas de corteza motora a nivel de láminas II-III. **B.** Se observa leve pérdida de integridad en corte de Grupo metformina Pre, contralateral con patrón de intensidad intermedia. **C.** Se observa pérdida de la integridad de dendritas con intensidad baja en la marcación en el grupo solución salina contralateral. Se observan también los somas de algunas neuronas. Foto 40x..... 67

Figura 19. Fotografía de las dendritas apicales marcadas con MAP2 en grupos experimentales. **A.** Cambios en las dendritas apicales del grupo solución salina en intensidad y alteración de la integridad (fragmentación, fechas) y **B.** Cambios similares, en el grupo metformina pre, 72 horas posterior a la isquemia cerebral ipsilateral exofocal. Se observa también pérdida de la marcación de cuerpos neuronales en láminas IV/V y reducción en la intensidad de la marcación para MAP2 en ambos grupos.

Foto 40x..... 68

Figura 20. Porcentaje de las observaciones de los cortes cerebrales obtenidos de cada grupo experimental de acuerdo a la intensidad de MAP2 observada en los diferentes cortes cerebrales de los grupos y de acuerdo al hemisferio ipsilateral o contralateral.

Grupo Sham con mayor porcentaje de intensidad intermedia en ambos hemisferios.

GM: Metformina pre; GM72: Metformina post; SSN: Solución Salina; A: Intensidad Alta.

M: Intensidad intermedia. B: Intensidad Baja. CL: Contralateral. IP: Ipsilateral 69

Figura 21. Porcentaje general de las observaciones cualitativas para los grupos experimentales de acuerdo a la intensidad para MAP2 en los cortes cerebrales. El grupo que mostró menor intensidad general fue el Grupo Metformina post 72 horas

(50%). GM: Metformina pre; GM72: Metformina post; SSN: Solución Salina

70

Figura 22. Astroцитos ubicados en lámina I-III de la corteza cerebral motora de grupo Sham.

Se observan células gliales con morfología normal sin cambios sugestivos de reactividad glial. Esta imagen tiene buena intensidad, no hay hipertrofia y tiene un conteo alto de células gliales. La flecha señala un astrocito hacia el límite de la lámina I/II. Foto 40x

71

Figura 23. Determinación de la respuesta glial contralateral en láminas V y VI de la corteza cerebral con el uso del marcador GFAP. A. Fotografía de la transición de lámina VI sustancia blanca donde se observa reactividad glial con cambios en la morfología y número de astroцитos en el grupo Solución Salina. **B.** Fotografía con astroцитos hacia lámina VI en grupo Sham, sin hipertrofia. **C.** Fotografía grupo metformina pre con leve reactividad glial en lámina VI. Fotografías 40x.

72

Figura 24. Diferencias porcentuales de la intensidad del marcador GFAP en los diferentes grupos experimentales del hemisferio del cerebro observado. El grupo Sham obtuvo un mayor porcentaje de intensidad intermedia para el marcador GFAP en ambos hemisferios. Hubo reducción en la intensidad de todos los grupos experimentales, principalmente en el grupo metformina Post (GM72) en ambos hemisferios. GM: Metformina pre; GM72: Metformina post; SSN: Solución Salina; A:

Alta. M: Intermedia. B: Baja. CL: Contralateral. IP: Ipsilateral

72

Figura 25. Histograma de los resultados del conteo neuronal del marcador NeuN por cada grupo con los valores promediados y con su SD estimada. Todos los grupos experimentales describen un menor conteo de neuronas comparado con el grupo Sham. El estriado ipsilateral tuvo los menores promedios de conteos en todos los grupos, principalmente en el grupo solución salina. Se encontraron diferencias significativas en el conteo en lado ipsilateral y contralateral exofocal en todos los grupos al compararse contra el grupo Sham * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ 75

Figura 26. Cortes coronales de la corteza cerebral contralateral con el marcador NeuN sobre la región motora dorsolateral. A. Sham, B. Grupo Solución Salina, C. Metformina Pre, D. Metformina Pos. Se aprecia reducción de la presencia de neuronas en la transición de láminas IV-VI en los grupos solución salina y metformina pos. Foto 10x. 75

Figura 27. Neuronas Parvoalbúmina positivas en la corteza motora de rata sham. Fotografía de la corteza cerebral motora, la flecha señala soma de interneurona en lámina II. Se observan interneuronas en todas las láminas excepto lámina I. Foto 10x. 77

Figura 28. Interneuronas positivas para Parvoalbúmina en la corteza motora contralateral. A. Grupo Sham, B. grupo solución salina, C. Grupo metformina pre D. Histograma de los resultados del conteo en los grupos experimentales para esta interneuronas Parvoalbúmina +. Se observa mayor reactividad e interneuronas en el lado contralateral del grupo solución salina. En el grupo Metformina Pre se observa menor presencia de interneuronas parvoalbúminas + hacia lámina II/III del lado contralateral exofocal. Foto 10x..... 78

Figura 29. Histograma de conteo de interneuronas positivas para parvoalbúmina en la corteza motora en la lámina V-VI. Se observa en el lado ipsilateral exofocal menor conteo en todos los grupos especialmente en el grupo control solución salina comparado con el grupo Sham. En el lado Contralateral se observa mayor reactividad con un aumento en el conteo de las interneuronas positivas para parvoalbúmina, especialmente en el grupo solución salina. Grupo metformina pre no tuvo cambios significativos en el conteo de interneuronas ipsi y contralateral en esta lámina. 79

Figura 30. Histograma de los resultados promediados para el conteo de interneuronas

positivas para Parvoalbúmina en las áreas exofocales ipsilaterales y contralaterales del estriado. Se observa una reducción importante en el conteo de interneuronas en el grupo experimental solución salina comparado con los otros grupos en el hemisferio ipsilateral exofocal. En el lado contralateral se aprecia aumento del conteo en todos los grupos, especialmente en grupo solución salina..... 80

Figura 31. Resultados promedio Escala de Bederson a las 24 y 72 horas post-isquemia. Todos los grupos presentan deterioro neurológico a las 24 horas posisquemia y recuperación neurológica a las 72 horas. Control: Grupo Solución salina. GM72: Grupo metformina Post. GM: Grupo metformina Pre..... 82

Figura 32. Resultados promedio de la Escala de García a las 24 y 72 horas post-isquemia. A mayor puntaje menos déficit neurológico (18: sin déficit; no se muestran resultados previos a la isquemia de grupos experimentales). Todos los grupos tienen puntajes altos al inicio con mayor deterioro a las 24 horas pos isquemia y parcial recuperación a las 72 horas. Control: Grupo Solución salina. GM72: Grupo metformina Post. GM: Grupo metformina Pre..... 82

Figura 33. Resultados del promedio de tiempo para aprender a pasar por la barra de un metro de largo (Beam Balance) previo a la isquemia. En tres días de entrenamiento previo, todos los grupos mostraron reducción en el tiempo para pasar por la barra, con 40 segundos de tiempo aproximado el primer día de entrenamiento a aproximadamente tres segundos para pasar al tercer día de entrenamiento. En el día 4 se realiza video y nueva prueba a todos los grupos. 72 horas posterior a la isquemia cerebral, se realizó de nuevo la prueba. Se observa que los grupos tratados con Metformina caen de nuevo a los tiempos obtenido el primer día de entrenamiento. * $p<0,05$ 83

2. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Desde el año 1998, El Centro de Estudios Cerebrales (CEC) de la Universidad del Valle ha desarrollado la línea de investigación “**Respuesta celular a la lesión cerebral**”, a través de la cual se ha tratado de entender la isquemia cerebral, la epilepsia y el trauma craneoencefálico con un enfoque de conectividad. Desde entonces, se han desarrollado 5 tesis de maestría, 3 tesis de doctorado y 8 publicaciones en revistas científicas indexadas (1,2).

Con el modelo en ratas de isquemia cerebral focal transitoria con perfusión, los investigadores de l CEC se han interesado en los efectos lejos del foco isquémico y de la zona de penumbra. Con estos modelos se han evaluado los cambios en la organización laminar cortical, de una subpoblación de interneuronas (aquellas que expresan proteínas atrapadoras de calcio como Parvoalbúmina) y de las células gliales (con marcadores contra GFAP) ipsilateral, y contralaterales a la lesión, y de otras estructuras exofocales a la lesión, como la Sustancia Negra Reticulata, procesos neurodegenerativos en curso posteriores a la isquemia cerebral de la arteria cerebral media derecha (3). Todos estos cambios observados en la corteza contralateral y en la Sustancia Negra Reticulata fueron coherentes con los patrones de conectividad de la región focal isquémica descritos hasta la fecha. El grupo de investigación también ha hecho hallazgos importantes en trauma craneoencefálico como la descripción histológica cualitativa y cuantitativa de la zona de contusión cerebral en humanos, identificando variaciones microscópicas en la severidad del daño de las subpoblaciones celulares corticales (4,5), el desarrollo e implementación de un modelo de cultivo organotípico agudo de tajadas de cerebro (6), susceptible de permitir la valoración de fármacos neuroprotectores. Con este conocimiento, en esta fase se plantea aprovechar este enfoque para evaluar los efectos de medidas terapéuticas promisorias en regiones exofocales, lo que permite aislar efectos neuroprotectores de los efectos vasculares. El presente trabajo continua en esta línea proponiendo el modelo en la valoración de un fármaco reconocido por sus múltiples mecanismos de acción.

3. RESUMEN

Los eventos isquémicos cerebrovasculares tienen una alta morbimortalidad en los humanos. Estudios recientes sugieren un papel neuroprotector de la Metformina en modelos de isquemia en ratas que han recibido tratamiento crónico con esta biguanida al observar una disminución del riesgo de transformación del ictus isquémico en hemorrágico, prevención de la apertura de poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) y el colapso del gradiente mitocondrial secundario en neuronas intactas entre otros efectos.

El objetivo del estudio fue observar los cambios celulares exofocales de la metformina en un modelo de isquemia cerebral focal transitorio en ratas

El presente estudio evaluó el papel neuroprotector de la metformina en el tejido nervioso exofocal ipsi y contralateral al foco isquémico en ratas Wistar. Se utilizó el modelo de isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media con reperusión a los 90 minutos. Se evaluaron dos esquemas de tratamiento: administrado crónicamente antes del ictus y administrado posterior al evento isquémico; usando controles con isquemia focal sin tratamiento y animales intactos.

La evaluación se realizó en dos dimensiones: Una evaluación neurológica clínica y una evaluación descriptiva de los cambios en regiones exofocales del cerebro. Para la primera dimensión se utilizó una prueba motora para valorar cambios clínicos 24 y 72 horas post-isquemia de los grupos experimentales comparado al resultado de la misma prueba antes de la isquemia. A las 72 horas las ratas se perfundieron, se comprobó el área infartada con uso de TTC, y se realizaron evaluaciones por inmunohistoquímica con NeuN para evaluar la organización citoarquitectónica, MAP-2 para observar los cambios en las proyecciones dendríticas y GFAP para describir la reacción glial en regiones exofocales: corteza y núcleo estriado ipsi y contralateral. Adicionalmente se describió los cambios en poblaciones de interneuronas de los mismos sitios exofocales con inmunohistoquímica para parvalbúmina.

El uso de crónico preventivo de metformina evitó un mayor tamaño del infarto al compararse con los otros grupos. Se encontró una reducción de neuronas viables en todos los grupos experimentales, especialmente en el estriado con mayor conteo de neuronas en el grupo que recibió metformina dos semanas antes de la isquemia. En el lado contralateral exofocal se observaron aumentos de la expresión de interneuronas positivas para parvalbúmina en el

grupo solución salina, sin cambios a ambos lados en el grupo que recibió metformina dos semanas antes de la isquemia, sugestivos de acciones neuroprotectoras en este subgrupo de interneuronas de rápido disparo. No hubo mejoría en el pronóstico clínico con el uso de metformina a las 72 horas post-isquemia.

Palabras Clave: Metformina, isquemia cerebral, neuroprotección, cambios exofocales, parvoalbúmina.

3.1 ABSTRACT

Cerebrovascular ischemic events have a high morbidity and mortality in humans. Recent studies suggest a neuroprotective role of Metformin used during large periods in ischemic brain models in rats, showing a reduction in the risk of transformation from ischemic stroke into hemorrhagic stroke, preventing mitochondrial permeability transition pore opening (PTP) and preserving blood-brain barrier integrity among other effects.

The present study evaluated the neuroprotective role of metformin in the motor and striatal cerebral cortex ipsi and contralateral to the ischemic core in 17 male wistar rats, weighing between 250 and 320 g (10 to 12 weeks of life approximately), randomly assigned in 4 groups: saline, metformin pre ischemia, metformin post-ischemia and sham group, with 5 rats for the first four groups and 2 for the sham group.

The cerebral ischemia model was achieved through occlusion of the middle cerebral artery for 90 minutes, caused by insertion of a silicone-coated monofilament through the right internal carotid artery to the Willys polygon, where obstruction occurred in the territory of the middle cerebral artery (MCAO) on the affected side (right hemisphere). A motor test was used before and after ischemia to assess clinical changes in the experimental groups. Neurological examination was also performed prior to ischemia and at 24 and 72 hours post-ischemia. After 72 hours post ischemia, rats were perfused with saline and paraformaldehyde 4% to obtain the nerve tissue samples (striatum and frontoparietal cortex) for the study of anatomopathological changes: Proportion of the infarcted area using TTC, state of the total neuronal population by evaluation of NeuN expression, description of apical dendrites with expression of microtubule-associated protein 2 (MAP2), description of glia changes with the use of GFAP, and assessment of parvoalbumin-positive interneurons subpopulations. A reduction of viable neurons was found in all experimental groups, especially striatum neurons, with a higher count of neurons in the group receiving Metformin two weeks prior to ischemia. The use of

metformin prior to infarction also resulted in a reduction in infarct size when used two weeks prior to ischemia compared to the other groups. Parvoalbumin had reduction in expression on ipsilateral side exofocal in saline solution group and great reactivity on the contralateral side. Metformin pre ischemia group had no changes in ipsilateral and contralateral counts. These findings suggest neuroprotective actions of metformin in this subgroup of fast-acting interneurons and, showing that this calcium-binding protein may be a sensitive marker to assess exofocal zones. There was no improvement in the clinical prognosis with the use of Metformin at 72 hours post-ischemia.

4. INTRODUCCIÓN

Los eventos isquémicos cerebrovasculares tienen una alta incidencia en las poblaciones con factores de riesgo como edad avanzada, tabaquismo, fibrilación auricular, dislipidemia, diabetes e hipertensión arterial (7). La enfermedad cerebrovascular es una de las principales causas de morbilidad en los adultos mayores, con grandes costos sociales por la pérdida de independencia y deterioro de la calidad de vida de los pacientes y sus cuidadores (8).

En la actualidad no se cuenta con fármacos que preservan y/o mejoran el pronóstico de un paciente con un evento cerebrovascular isquémico. Se han estudiado varias opciones como agentes neuroprotectores en los eventos cerebrovasculares como la minociclina, la hormona liberadora de Tirotropina (TRH), la eritropoyetina (EPO) y el uso de corticosteroides con buenos resultados en modelos animales pero sin aplicaciones aún en humanos (9,10). Sin embargo, en los pacientes con Diabetes Mellitus 2 se ha observado un menor riesgo de accidente cerebrovascular y de una menor mortalidad asociada al uso crónico de metformina (11).

Este hallazgo tiene importancia porque podría ayudar a encontrar nuevas oportunidades terapéuticas para este fármaco antidiabético si se comprenden sus efectos en el tejido nervioso. A nivel experimental, se han demostrado varios efectos en la isquemia cerebral como su papel protector en los vasos cerebrales y una disminución del área isquémica en modelos de isquemia en ratas (12).

Por la imposibilidad ética que representa el estudio de fármacos candidatos como neuroprotectores en humanos actualmente solo se cuenta con la evidencia obtenida en las últimas décadas respecto del pronóstico, evolución y mortalidad de los eventos cerebrales isquémicos en aquellos pacientes con un riesgo cardiovascular elevado como los pacientes con diabetes, hipertensión y/o obesidad. Por este motivo, desde que Koizumi y colaboradores en 1986 propusieron el primer modelo animal de isquemia cerebral a través de la inserción de un monofilamento por la arteria carótida interna hasta alcanzar el origen de la arteria cerebral media, su implementación se ha difundido en los grupos que investigan las diferentes características de esta patología dada su sencillez y replicabilidad (13). Actualmente este modelo es utilizado para valorar la viabilidad de los fármacos candidatos con acciones neuroprotectores en los eventos isquémicos cerebrales. La presente propuesta

tiene como objetivo determinar los efectos neuroprotectores de la metformina a través de la valoración de los cambios clínicos y estructurales en un modelo experimental de isquemia cerebral focal transitoria en ratas con una perspectiva en las regiones exofocales que aísla el evento del tejido nervioso respecto a los cambios vasculares valorando más el impacto de la lesión que el tamaño o extensión.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. DEFINICIÓN, HISTORIA Y ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS ACCIDENTES CEREBROVASCULARES

Los accidentes o eventos cerebrovasculares producen lesiones neurológicas a través de dos mecanismos: hemorrágicos o isquémicos. Las hemorragias se caracterizan por ser sangrados cerebrales que pueden estar ubicados en regiones o tejidos específicos del sistema nervioso central conocidas como hemorragias parenquimatosas o los sangrados hacia el espacio donde circula el líquido cefaloraquídeo conocidos como hemorragias subaracnoideas. La isquemia cerebral se refiere a una disminución en la perfusión del tejido cerebral por reducción de la circulación local, generalmente distal y secundaria a un trombo (obstrucción de la arteria, usualmente secundaria a aterosclerosis) o un émbolo (obstrucción secundaria a la liberación de micropartículas o coágulos desde otros sistemas como por ejemplo en la fibrilación auricular). A este proceso de reducción del flujo sanguíneo por una obstrucción se le denomina trombosis. Clínicamente se diferencian la etiología de los eventos trombóticos como de grandes vasos (usualmente extracraneales) y de pequeños vasos (intracraneales, como sucede con las ramas de la arteria cerebral media que ascienden hacia la cápsula interna). El 80% de los accidentes cerebrovasculares son isquémicos, el 20% restante son hemorrágicos (14).

Los eventos cerebrovasculares son la principal causa de discapacidad y la segunda causa de muerte en adultos. La mayoría de los sobrevivientes (más de la mitad) dependen de otras personas para realizar sus actividades cotidianas. La relación con la presión arterial elevada fue reconocida en la década de 1920, pero; fueron las observaciones recopiladas por el estudio Framingham (Framingham Heart Study) las que guiaron los estudios epidemiológicos que permitieron determinar a la hipertensión arterial como el principal factor de riesgo para el desenlace de un evento vascular de este tipo (15,16). Los eventos isquémicos cerebrales representan el 80% de los casos totales, la hemorragia intracerebral primaria el 10% y la hemorragia subaracnoidea el 5% restante. (16,17). El impacto económico de los eventos cerebrovasculares en la población es enorme (9). Altos costos para los sistemas de salud, pensiones y sobretodo para las familias de los pacientes.

El aumento en la expectativa de vida en todo el mundo, incluida Colombia, supone un reto mayor para el tratamiento y/o prevención del infarto cerebral. En la actualidad existen diferentes modelos farmacológicos que ofrecen resultados promisorios a nivel experimental, pero aún no existe un tratamiento con evidencia suficiente sobre sus propiedades neuroprotectoras para ser recomendado en los pacientes (9).

5.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

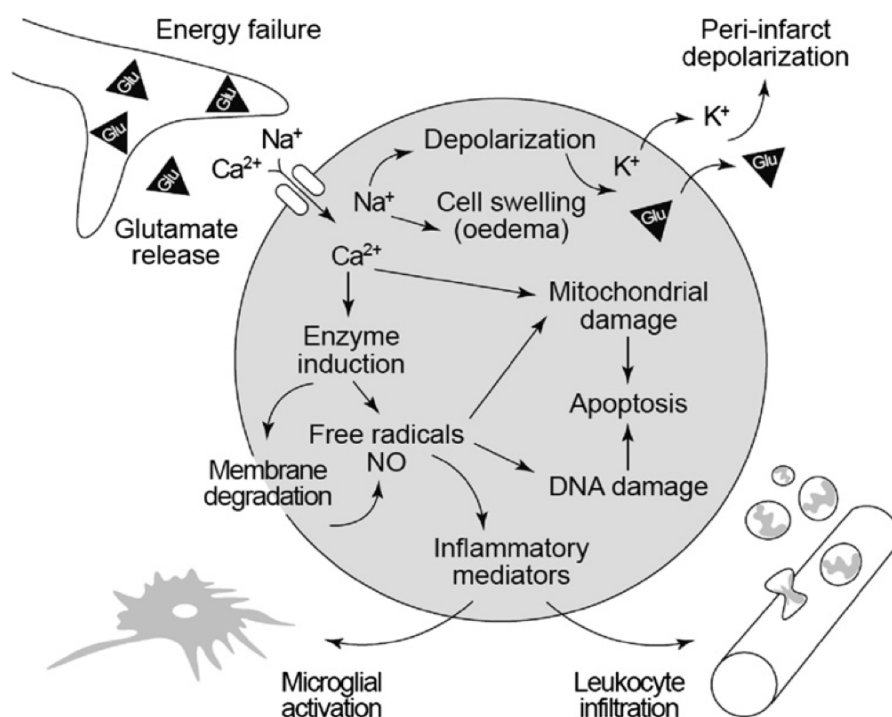


Figura 1. Simplificación de los mecanismos fisiopatológicos en la isquemia cerebral focal.
Tomado de A. Kuntz et al. / *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 24 (2010).

Los accidentes cerebrovasculares pueden ser secundarios a un grupo heterogéneo de enfermedades como la oclusión de una arteria cerebral, la hemorragia cerebral, la trombosis venosa o por una disminución súbita de la perfusión cerebral como se observa en la parada cardíaca donde se presenta una disminución transitoria o definitiva del flujo sanguíneo en el territorio de una arteria cerebral (18). Posterior a la oclusión o perfusión por una arteria cerebral (como la Arteria Cerebral Media), la reducción en el flujo sanguíneo cerebral se

hace crítica en unas regiones donde la muerte neuronal es inevitable y se le denomina como foco (o núcleo) de la lesión. En el área circundante, conocida como área de penumbra isquémica, prevalece una perfusión residual y las células están funcionalmente alteradas pero aún son potencialmente viables. En la mayoría de los casos, el área del foco o núcleo crece a costa del área de penumbra (1,15,19,20).

La Figura 1 es un resumen gráfico de los eventos descritos en un evento isquémico. El parénquima cerebral al no obtener oxígeno y glucosa como sustrato para la generación de sus fuentes energéticas a través de la fosforilación oxidativa, presenta un déficit local energético con la alteración de las bombas que mantienen los gradientes iónicos y la consecuente despolarización secundaria de las neuronas y de la glía. La entrada masiva de cationes de sodio ocasiona edema celular ya que el sodio arrastra las moléculas de agua hacia el interior celular. El déficit local de energía despolariza las neuronas provocando la activación de los canales de calcio y la liberación de glutamato que a altas concentraciones es excitotóxico. El calcio al comportarse como un segundo mensajero, activa cascadas enzimáticas que comprenden fosfolipasas y proteasas que degradan proteínas y membranas esenciales para la integridad celular (17). La generación de especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y radicales superóxido pueden causar daño directo del DNA, la membrana plasmática y organelas como la mitocondria donde se altera la transición de la permeabilidad mitocondrial con una disrupción de la producción de ATP y en algunos casos liberación de moléculas proapoptóticas (21). La pérdida del sustrato energético y del oxígeno causa una liberación aguda de glutamato en el núcleo de la lesión. Desde esta región se originan ondas repetitivas de despolarización que llegan a la zona de penumbra isquémica y contribuyen al daño tisular y ocasionan aumento del área del núcleo isquémico (17). La inflamación secundaria a un evento isquémico cerebral es un evento que contribuye a efectos deletéreos observados en las células del tejido cerebral incluidas las neuronas. Las citoquinas proinflamatorias son moléculas importantes que se liberan justo después de ocurrir la isquemia. Se ha reconocido al Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleuquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 como inductoras de la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM) en las células endoteliales principalmente (22). Estas moléculas de adhesión permiten el paso transendotelial de células del sistema inmune hacia el parénquima cerebral afectado con lo cual favorecen su infiltración leucocitaria y neutrófila (19,22). Contener o disminuir esta respuesta inflamatoria secundaria a la isquemia cerebral es una estrategia

terapéutica que ha sido investigada en el pasado. En este sentido, el bloqueo del receptor de IL-1 β ha sido propuesto como blanco terapéutico en la enfermedad cerebrovascular aguda y crónica y en la actualidad existen aproximaciones para la inhibición de este receptor para su uso en humanos (22). Otra observación es el fenómeno de preconditionamiento celular que consiste en la inflamación previa por eventos vasculares menores o transitorios (conocidos como TIA) los cuales protegen contra la lesión por isquemia posterior a una oclusión vascular severa o un infarto masivo, al parecer por desensibilización contra las acciones de IL-1 β . (17,22–24)

5.3. METFORMINA COMO CANDIDATO A NEUROPROTECTOR

Se define un neuroprotector como el agente que previene la muerte neuronal al inhibir uno o más pasos fisiopatológicos en el proceso que sigue a la lesión del sistema nervioso o a la isquemia debida a la oclusión de una arteria o por la hipoxia de cualquier causa (9). Algunos objetivos biológicos descritos con probables propiedades neuroprotectoras intrínsecas son la expresión de genes Bcl-2, c-fos/jun, la sobreexpresión de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el Factor de crecimiento neuronal, agentes antioxidantes como la superóxido dismutasa, el transportador de aminoácidos excitatorios (EEAT) y el neuropéptido galanina entre otros (22). Son necesarias medidas terapéuticas adicionales que garanticen un mejor pronóstico en estos pacientes que son aquejados por los eventos cerebrovasculares ya sea desde un punto de vista neuroprotector para evitar un peor desenlace, o como tratamiento médico eficaz en la reducción de la mortalidad y discapacidad secundaria. Por estos motivos, se hace necesario seguir con esta línea de investigación en isquemia cerebral, ya que según los datos demográficos del DANE la pirámide poblacional del país indica un cambio que evidencia claramente un aumento en el promedio de vida del país y una población adulta creciente¹.

La Metformina ha demostrado ser un candidato promisorio en aquellos pacientes que estén en riesgo de presentar accidentes vasculares. Chen y colaboradores hicieron un estudio prospectivo en Tailandia, por 4 años basado en los registros electrónicos médicos de 14.856 pacientes y estimaron una reducción de casi 50% para episodios de accidentes

¹ Tomado de revista DANE, https://www.dane.gov.co/revista_ib/html_r4/articulo2_r4.htm

cerebrovasculares (hazard ratio 0.46, IC95%: 0.424-0.51, $p < 0.001$) en pacientes con diabetes tratados con Metformina versus paciente que no la usaban (11).

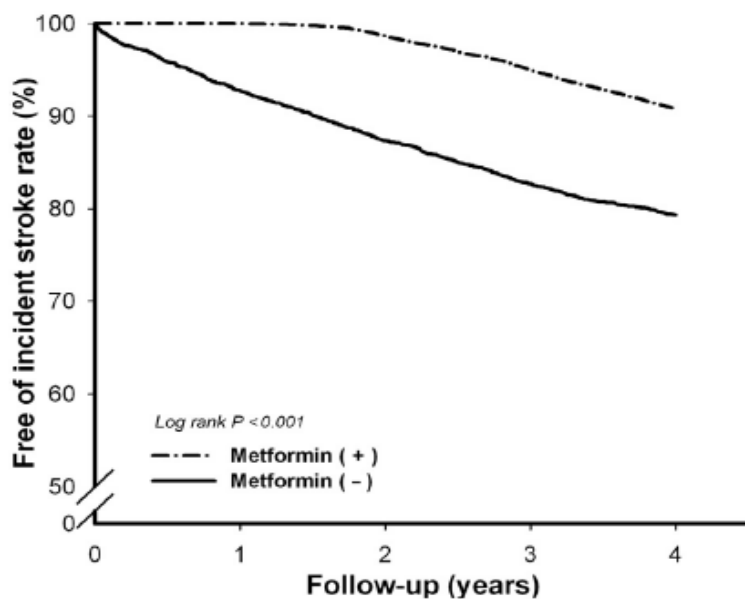


Figura 2. Seguimiento por 4 años a pacientes con diabetes con reducción de casi el 50% de episodios de Stroke en el grupo de pacientes que usan Metformina y Tomado de: Cheng Y. et al. *Stroke and Cerebrovascular Diseases*. vol: 23 (2). 2014

El beneficio clínico del uso de metformina en pacientes con diabetes y la prevención de la enfermedad isquémica cerebral fue descrito en un análisis retrospectivo por Mima y colaboradores que reportó una reducción de severidad de los síntomas neurológicos, incluso en pacientes con enfermedad renal crónica asociada (25). Sin embargo, la etiología de estas descripciones epidemiológicas no se ha establecido con certeza. En todo caso, el control de los niveles de glucemia no es la única causa que explique la reducción de los eventos cerebrovasculares en estos pacientes.

Existen estudios en modelos animales que han valorado su papel neuroprotector en las células afectadas en el núcleo isquémico y en la región de penumbra (alrededor del foco o núcleo isquémico, o corteza cerebral ipsilateral a la lesión) pero en la actualidad no hay investigaciones publicadas que reporten los cambios tisulares distantes del foco isquémico (26–28). Esta evidencia publicada, hace de la metformina un candidato prometedor como probable agente neuroprotector para aquellos pacientes que estén en riesgo elevado de presentar un accidente cerebrovascular.

5.4.

GENERALIDADES FARMACOLÓGICAS DE LA METFORMINA

5.4.1. HISTORIA Y MECANISMO DE ACCIÓN

La Metformina es una biguanida que fue propuesta como antidiabético oral hace 50 años. Actualmente es recomendada como primera línea en el manejo de pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus 2. Hasta hace una década se consideraba que su mecanismo de acción estaba relacionado con la activación de la AMPK (AMP protein cinasa activada). La AMPK es una proteína serina/treonina cinasa que funciona como un sistema de monitoreo energético que protege las funciones celulares durante los episodios de alteraciones energéticas en especial cuando el cociente AMP/ATP se ve afectado a favor de AMP, como ocurre en los eventos isquémicos (26,29). La AMPK es una proteína heterotrimérica que está formada por tres dominios α (catalítico), β y γ que son subunidades regulatorias. Su activación se hace a través de su sector regulatorio ubicado en la subunidad- γ . El aumento en las concentraciones locales de AMP provoca un cambio conformacional en la subunidad- α que evita la desfosforilación de la Thr172 y permite su activación final.

La fosforilación de AMPK requiere de cinasas contracorriente identificadas como STK11 (supresor tumoral Serine/treonina kinasa 11, conocida también como LKB1, liver kinasa B1) y CaMk β (protein kinasa β dependiente de calcio-calmodulina). La activación de AMPK cambia las células de un estado anabólico a uno catabólico, reduciendo las vías que consumen ATP y restaurando el balance energético (26,29).

A nivel periférico, la AMPK regula la expresión de genes que favorecen la biosíntesis de lípidos y el aumento del uso de energía proveniente de la oxidación de los ácidos grasos. Se ha demostrado su presencia en las neuronas y su rápida activación durante los eventos isquémicos en ambos hemisferios.

Estudios con ratones knockout para AMPK y LKB1 en los hepatocitos, demostró que los efectos metabólicos observados (hipoglucémicos) con la Metformina aún estaban presentes (24). Esto ha permitido considerar que la activación de AMPK por la Metformina puede tener un mecanismo indirecto.

En la actualidad se considera que su principal efecto en el tratamiento de la Diabetes es la disminución de la producción hepática de glucosa probablemente secundaria a una inhibición específica del complejo de la cadena respiratoria mitocondrial tipo I con la disminución de la

oxidación de NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido), el flujo de protones a través de la membrana interna mitocondrial y el menor consumo de oxígeno, que finalmente llevan a una reducción en la síntesis de ATP desde el ADP y los fosfatos libres (Pi)(26,29). Como el ATP es requerido para la gluconeogénesis, en los hepatocitos con bajos niveles de trifosfato, habrá una consecuente disminución en la producción endógena de glucosa (Figura 3).

5.4.2. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FARMACOCINÉTICA DE METFORMINA

Metformina tiene un pKa cercano a 12,4 por lo que en condiciones fisiológicas estará en una forma protonada con un paso parcial a través de la membrana hematoencefálica. La acción preferencial en los hepatocitos de la Metformina se debe a la expresión predominante de un transportador orgánico de cationes (OCT₁, gráfico 3) el cual facilita la captura celular de Metformina. La isoforma OCT₂ se expresa preferencialmente en los riñones y se asocia con la excreción renal de esta biguanida. La expresión neuronal de OCT₂ en ratas también se ha reportado en áreas ricas en dopamina como son la sustancia *nigra*, el núcleo Accumbens y el estriado en general (29). Se ha demostrado la presencia de Metformina posterior a una dosis única en cerebros de ratas en un modelo de inflamación sistémica inducida por lipopolisacáridos (LPS) con dosis orales entre 150 mg/kg (agudo) hasta 300 mg/Kg/día en tratamientos crónicos por 3 semanas (30). También se detectaron niveles de Metformina por HPLC en el líquido cefalorraquídeo, estriado, hipocampo, cerebelo, glándula pituitaria y corteza frontal (30).

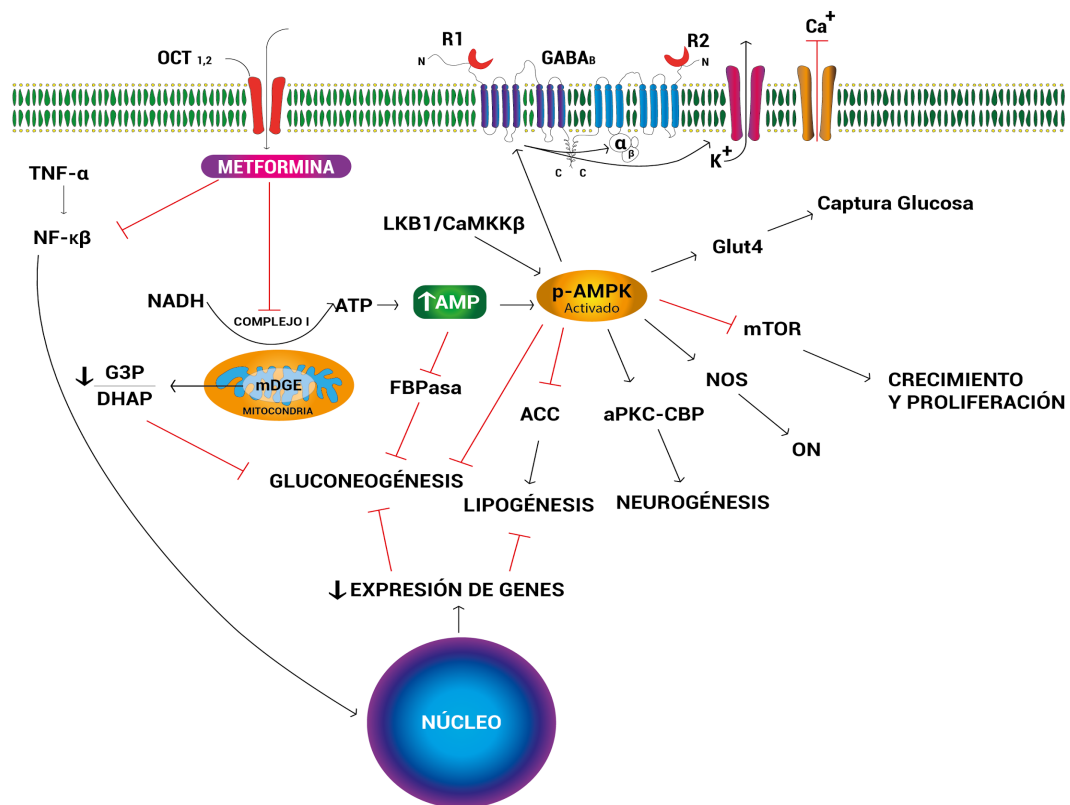


Figura 3. Diferentes vías celulares descritas para la acciones de la Metformina. La glucogénesis es inhibida por cambios en la expresión de genes específicos (igual para lipogénesis), inhibición de FBPaasa y cambios en los cocientes de ATP/AMP, G3P/DHAP y lactato/piruvato. En las neuronas, AMPK puede tener diferentes acciones ya que estas no tienen las enzimas glucolíticas y por esto tienen capacidad reducida de almacenar nutrientes y responder a los déficit energéticos con alto riesgo de acidosis láctica. El receptor GABA_B está involucrado en los efectos neuroprotectores de la Metformina a través de la hiperpolarización secundaria a la liberación de K⁺ y la inhibición de entrada de calcio. OCT: Transportador catiónico orgánico. GP3: Glicerol-3-fosfato. mDFG: deshidrogenasa glicerofosfato mitocondrial. DHAP: dihidroxicetona fosfato. eNOS: sintasa endotelial de óxido nítrico. ON: óxido nítrico. aPKC: proteína cinasa C atípica. CBP: Proteína de unión al CREB. NF-KB: Factor nuclear kappa beta. TNFa: Factor de necrosis tumoral alfa. FBPaasa: Fructosa 1,6 bifosfatasa. ACC: acetilCoA Carboxilasa. CaMKK: cinasa beta dependiente de calmodulina. mTOR: objetivo de rapamicina en células de mamíferos. Los demás efectos observados con la Metformina como la mayor sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina con el ejercicio, mayor captura de glucosa y disminución del perímetro abdominal pueden ser secundarios a la activación indirecta de LKB1 (la cual activa AMPK) en las células

con una disminución de los niveles citoplasmáticos de ATP (27,28). Tomado de Arbeláez I, 2017 (31)

5.4.3. ESTADO ACTUAL DE LOS ESTUDIOS QUE HAN EVALUADO EL PAPEL NEUROPROTECTOR DE METFORMINA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Existe evidencia del papel neuroprotector de la metformina en modelos de isquemia en ratones con su uso crónico durante 3 semanas antes de la isquemia, en relación con una menor área infartada y la inhibición de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS)(24). Se ha demostrado también un rol de la AMPK en la isquemia, ya que la activación de la AMPK-dependiente de Metformina puede tener efectos deletéreos y exacerbar el daño celular ocasionado por la isquemia cuando se suministra en forma aguda (24). Metformina aumenta los niveles de lactato en el cerebro probablemente por la glucólisis anaerobia secundaria a la activación de un estado catabólico por la AMPK (24).

Al observar los parámetros bioquímicos ipsilaterales como la muerte neuronal inducida por el etopósido en cultivos celulares de neuronas primarias de ratas, la Metformina tuvo efectos positivos al aumentar la capacidad buffer del calcio en las mitocondrias de las neuronas permeabilizadas, en la prevención de la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PTP) de la mitocondria y el subsecuente colapso del gradiente mitocondrial y en evitar la liberación del citocromo C (32). Elgelaby y colaboradores observaron un efecto vascular protector en ratas diabéticas al evitar la transformación del ictus isquémico a hemorrágico (12). Li y colaboradores describieron que el tratamiento crónico con Metformina intraperitoneal 50mg/k/día por 3 semanas antes de la isquemia tiene una reducción en el área y volumen final del infarto, disminución en la generación de lactato, inhibición de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y una regulación a la baja de la AMPK la cual está implicada en el mayor deterioro metabólico cuando se da Metformina después de producir la isquemia (en forma aguda) (24). Estos autores sugieren que el tratamiento crónico con esta biguanida puede llevar a un estrés metabólico subletal y a una regulación a la baja de la AMPK protegiendo al cerebro de lesiones isquémicas futuras. Carvalho y colaboradores estudiaron un modelo de ratas diabéticas al comparar los resultados en muestras de cerebros homogenizados y encontraron que la Metformina inducía una reducción en los niveles de los marcadores de peroxidación lipídica (TBARS) y de la actividad de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, sugiriendo acciones de la metformina sobre el estrés oxidativo lo que

podría tener efectos neuroprotectores (33).

Takas y colaboradores destacan un papel regulador de la metformina en la preservación de la barrera hematoencefálica (BHE) después de evaluar las funciones de la BHE en células endoteliales de rata y observar un aumento en la resistencia eléctrica transendotelial y una disminución de la permeabilidad al sodio y la albúmina con el uso de metformina (28). Según Jin Q y colaboradores, la metformina también tiene efectos en la promoción de la neurogénesis y angiogénesis posterior a una isquemia cerebral al observar sus efectos en cultivos neuronales con células gliales de origen murino (27). Según los autores, en el ratón adulto la metformina promueve la génesis de neuronas en el hipocampo de una forma CBP-dependiente.

5.4.4. PAPEL DE LA AMPK COMO EFECTOR DE METFORMINA.

Como las neuronas son muy sensibles a los déficits energéticos, no es sorprendente la gran expresión observada de AMPK en el Sistema Nervioso Central durante los eventos isquémicos. Sin embargo existe controversia sobre el papel de la AMPK a nivel neuronal y sus efectos protectores o perjudiciales en la isquemia cerebral (34). Kuramoto y colaboradores describieron efectos neuroprotectores de la activación de AMPK en un modelo de isquemia cerebral en roedores, al favorecer la activación del receptor metabotrófico GABA_B y sus acciones inhibitorias a través del acople a un receptor de proteína G (G_i/G_o) postsinápticos con la hiperpolarización neuronal secundaria (35). McCullough y colaboradores describieron resultados opuestos en el 2005 al observar efectos neuroprotectores con el uso de un inhibidor de la AMPK conocido como compuesto C y ratones knockout para AMPK1 y 2 (36). En este estudio, McCullough también fue el primero en reportar una relación entre el efecto de la AMPK activada y la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) en un modelo de isquemia cerebral en ratones (ver más abajo). En los eventos isquémicos la activación de la AMPK en las neuronas tiene efectos deletéreos quizás secundarios a la capacidad glucolítica reducida de estas al compararse con los astrocitos (18). Por este motivo la prolongada producción de moléculas de ATP a través de la glucólisis anaeróbica por los astrocitos, puede llevar a la aparición de acidosis e inhibición del uso de lactato como sustrato energético por las neuronas.

Li y colaboradores fueron más específicos en describir la actividad de cada isoforma AMPK1 y AMPK2 al demostrar que la inhibición o inactivación aguda de la isoforma 2 es

la responsable de los efectos neuroprotectores en los modelos de isquemia cerebral en ratones (34,37).

Tabla 1. Estudios en cultivos neuronales y el endotelio cerebral que han evaluado el papel neuroprotector de la metformina en la isquemia cerebral. Arbeláez et al, 2017 (31)

Biomodel	Culture	Effects	Postulated mechanism	Doses	Ref
Rat	Culture of primary neurons of day 17	Antiapoptotic	Pore opening inhibits mitochondrial permeability transition	100 µg for 24 hours	[25]
Mice	Immunostaining hippocampal sections	Neurogenesis	Metformin activates the aPKC-CBP pathway in neurons and induces neurogenesis of human neurons in culture. In adult mice, it induces neurogenesis in the hippocampus and olfactory bulb. Spatial learning tests improved in mice	Daily injected metformin (200 mg/kg) and BrdU for 3 days, and then only metformin for 9 days	[70]
Rat	Culture of cortical neurons from embryos obtained on gestation day 17,5	Antiapoptotic	Decreases neuronal death, inhibits apoptosis activation, maintains the mitochondrial gradient, inhibits cytochrome c release, and regulates internal calcium homeostasis	Culture at a high concentration of ethanol and groups received metformin (100 mM) and/or thymoquinone	[68]
Rat	Primary cultures of rat brain endothelial cells	Maintained integrity of BBB	Decreases sodium pass and maintains transmembrane electric gradient	Metformin dissolved 1 mM	[61]

Posteriormente en el 2010 Li y colaboradores probaron las acciones neuroprotectoras de la Metformina en un modelo de isquemia cerebral por 90 minutos (isquemia/reperfusión) donde reportaron la activación de AMPK en el tratamiento agudo y su regulación a la baja en el tratamiento crónico con Metformina, aumento del tamaño del infarto en los grupos que recibieron dosis agudas de Metformina (24 y 72 horas antes del ACV) versus reducción del área del infarto con el tratamiento por 3 semanas antes de la isquemia (24). También describieron que en ratones knockout para la AMPK durante el tratamiento agudo con Metformina, se eliminaba los efectos deletéreos de esta en la isquemia y que sus efectos neuroprotectores estaban mediados por el óxido nítrico al demostrar que el efecto deletéreo de la Metformina en los cuadros isquémicos agudos se evitaba en ratones knockout para la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS). El tratamiento crónico con Metformina disminuyó la activación de AMPK. McCullough y colaboradores observaron que el preacondicionamiento isquémico con una isquemia de 3 minutos 72 horas antes de la MCAO definitiva, tuvo efectos neuroprotectores en ratones secundarios a la inhibición de la AMPK y aumento en la expresión de HSP70 (38).

Jiang y colaboradores evaluaron los efectos neuroprotectores de realizar un preacondicionamiento isquémico con Metformina al favorecer la autofagia dependiente de AMPK. Los autores consideran que este proceso celular puede tener efectos neuroprotectores al aumentar la tolerancia a la isquemia al facilitar la producción de energía y prevenir la apoptosis posterior (39).

Por otra parte, el papel del óxido nítrico en la isquemia cerebral ha sido revisado recientemente por Terpolilli y colaboradores. El óxido nítrico tiene un aumento hasta de 20 veces su valor basal a nivel cerebral 30 minutos después de la oclusión de la arteria cerebral media, secundario al aumento en la disponibilidad de calcio y la activación de nNOS. Entre las tres sintasas descritas a la fecha, la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS), la activación de la eNOS tiene acciones favorables a nivel endotelial como favorecer la remodelación vascular y la angiogénesis (40). Se ha observado en cambio que la activación de la nNOS tiene efectos deletéreos en los cuadros agudos isquémicos igual que la iNOS, pero esta última favorece la neurogénesis durante su activación prolongada. Yanqun y colaboradores describieron efectos protectores de la Metformina (con la dosis de 200 mg/kg) en la alteración de la barrera hematoencefálica posterior a la oclusión de la ACM por 90 minutos en ratones al disminuir su permeabilidad y la infiltración por neutrófilos al inhibir la expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) secundario a la activación de la AMPK (41).

5.4.5. ACCIONES VASOPROTECTORAS DE LA METFORMINA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL EN RATAS

La activación de la AMPK puede tener efectos protectores endoteliales que expliquen la disminución del riesgo cardiovascular observada en pacientes diabéticos que utilizan este antidiabético oral. Estas acciones protectoras de la Metformina a nivel vascular fueron valoradas por Elgebaly y colaboradores en el modelo de isquemia cerebral en

ratas con diabetes expuestas a minociclina y Metformina por 4 semanas para determinar sus efectos en el remodelamiento vascular en esta condición, el papel de las metaloproteinas de matriz (MMP) 2 y 9 en estos cambios vasculares y el riesgo de transformación hemorrágica posterior a la isquemia de la ACM. Concluyeron que todos los marcadores de remodelamiento vascular como la tortuosidad de los vasos, el número de colaterales de la ACM, el número de anastomosis, el diámetro de las arterias colaterales de la ACM y la actividad de la MMP-9 estaban aumentados en ratas diabéticas. En los grupos expuestos a Metformina hubo una reducción significativa de estos índices de remodelación vascular, una reducción asociada de la actividad enzimática de MMP-9, una menor área de infarto comparado con los controles y un efecto vasoprotector al evitar su transformación hemorrágica (12).

5.4.6. ACCIÓN DE LA METFORMINA EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL SECUNDARIA A LA ISQUEMIA CEREBRAL

Mohamad-Yehia y colaboradores reportaron efectos neuroprotectores de la Metformina al evitar la muerte celular de neuronas corticales primarias al prevenir la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial en presencia de un inductor de muerte neuronal (etopósido) (32).

También se han descrito acciones neuroprotectoras de la Metformina sola (o en combinación con timoquinona) en cultivos de neuronas corticales primarias expuestas al etanol (100 mM), al disminuir la muerte neuronal, prevenir la alteración de la homeostasis citoplasmática de calcio, evitar la alteración del gradiente mitocondrial, aumentar la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico) y disminuir la expresión de Bax (proapoptótico), reducir la liberación de citocromo c e inhibir la actividad de la caspasa-9 inducida por el etanol.

Ghobargol y colaboradores en un modelo de isquemia cerebral focal (oclusión de 4 vasos cerebrales) en ratas observaron que el preacondicionamiento con Metformina a una dosis de 200 mg/k/día por gavaje atenuó la apoptosis de neuronas ubicadas en CA1 en hipocampo al determinar su efecto en los niveles de Bax/Bcl-2, caspasa 3 y PARP (42). Además indujo la biogénesis mitocondrial de proteínas en especial de la PGC-1 (coactivador receptor gamma activador de proliferador 1). Estos efectos fueron anulados con el uso del inhibidor de AMPK el compuesto C.

Curiosamente, usaron dosis de metformina de 100, 200 y 400 mg/k/día por vía oral con mejores resultados neuroprotectores para la dosis de 200 mg/k/día, que de acuerdo a las características farmacocinéticas descritas previamente, es la concentración esperada con una mejor biodisponibilidad (42).

En la Tabla 2 se relacionan los diferentes estudios publicados que han utilizado Metformina en estudios de isquemia cerebral en roedores. La mayoría de estos indican resultados favorables a su uso como neuroprotector.

5.5. MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL Y CAMBIOS EXOFOCALES SECUNDARIOS

El modelo exofocal permite valorar las neuronas y la glía lejanas al foco isquémico pero conectados a través de las fibras comisurales en regiones ipsilaterales y contralaterales. Este modelo nos permite además observar los cambios celulares puros (neuronales, en nuestro caso) sin el efecto vascular observado en el lado ipsilateral exofocal que no es irrigado por la arteria cerebral media. Con esto se puede determinar los cambios en las neuronas afectadas no por alteración en la perfusión local del tejido, sucesos descritos en la literatura, sino por los cambios agudos que ocurren en las regiones con las cuales hay conexiones. En el lado ipsilateral también se describen otras regiones exofocales como la región más medial (giro cingulo) de la corteza cerebral motora, el cual es irrigado por la arteria cerebral anterior y el estriado en su porción ventromedial (ipsilateral) y dorsolateral (contralateral). Este modelo experimental nos permite evaluar los efectos de la metformina sobre el componente piramidal y no piramidal de la corteza cerebral y el estriado y de esta manera determinar si estas neuronas que se encuentran lejanas del foco isquémico (ipsilateral y contralateralmente) pero conectadas por fibras asociativas y/o comisurales y afectadas por la lesión isquémica, presentan algún patrón de recuperación (ver Figura 4).

Estos aspectos mencionados son relevantes teniendo en cuenta que las láminas II y III de la corteza frontal están directamente involucradas en los procesos mentales superiores y son las láminas donde hacen sinapsis las aferencias del hemisferio opuesto provenientes de la lámina III.

Las áreas ipsilaterales involucradas en la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas son la corteza frontoparietal (sensorio-motora), insular, corteza entorrinal, sustancia *nigra*, estriado y globo pálido (1,20). En oclusiones < 60 minutos se observan zonas de

necrosis postinfarto en el estriado, si el tiempo de oclusión es > 60 minutos se puede observar zonas de necrosis en otras áreas corticales y en la formación hipocampal (24). El daño hipocampal se observa temprano, posiblemente debido al compromiso de la arteria cerebral posterior (PCA) la cual tiene conexión con la carótida interna (ICA) a través de la arteria comunicante posterior (PCOM). Como se requiere la manipulación de la carótida interna durante el procedimiento, algunos territorios irrigados por sus ramas pueden verse afectados como el tálamo, hipotálamo y la amígdala. Las isquemias más prolongadas (>60 min) tienen resultados más uniformes y concluyentes respecto del área infartada (43).

Las áreas cerebrales con isquemia parcial tienen un flujo sanguíneo cerebral (FSC) disminuido hasta aproximadamente 20mL/100g/min. En las zonas de penumbra se ha observado muerte celular programada posterior a la activación de la microglía y al proceso inflamatorio local, ya descrito. En el foco isquémico se produce liberación de potasio (K^+) que facilita la despolarización de neuronas vecinas aumentando el estrés oxidativo. Un mecanismo de depresión propagada (Spreading Depression) permite que las concentraciones extracelulares de potasio sean transportadas a otros sectores del encéfalo al activarse la red astrocítica que funciona como un buffer espacial (1). Se han descrito lesiones exofocales contralaterales secundarias a la muerte neuronal en el foco de la isquemia que incluyen cambios en el flujo sanguíneo, fragmentación del citoesqueleto a partir del 3 día post-isquemia, disminución de la inmunorreactividad en las dendritas y el soma, cambios en la orientación del árbol dendrítico de las células piramidales glutamatérgicas marcadas con MAP2 (proteína asociada a los microtúbulos 2) y la activación de la macroglía en zonas distantes (astrocitos hipertróficos y extensión de sus procesos) (20).

Hay evidencia publicada de cambios secundarios exofocales posisquémicos en el tálamo (núcleo ventral posterior, VPN), la sustancia negra *pars reticulata*, el hipocampo y la médula espinal consistentes en la activación de la microglía y los astrocitos a través de la liberación de IL-6, IL-1 α/β , TNF- α e interferón (24). La expresión de estas citoquinas tienen diferencias de acuerdo con la región cerebral estudiada como se observa en las mediciones de TNF- α , ausente en las neuronas talámicas versus las neuronas de la sustancia *nigra* donde se detectan aumentos en su concentración posisquemia. En el hipocampo se observa una mayor expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) lo cual es un signo de reactividad astrocítica (24).

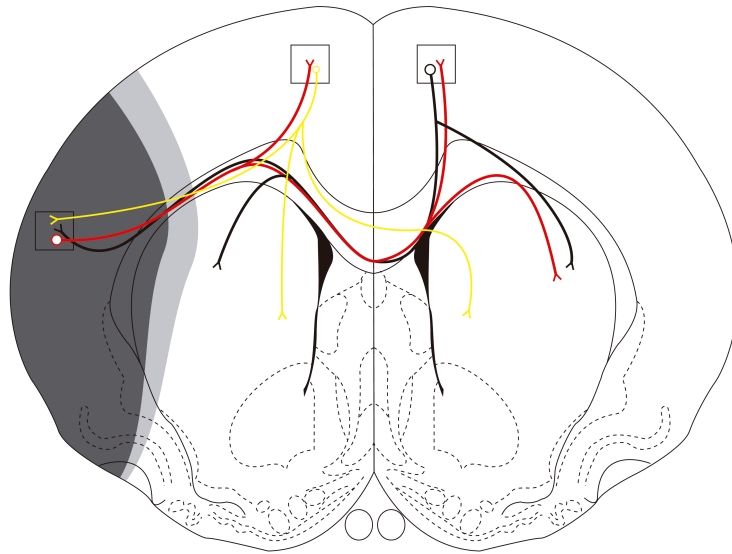


Figura 4. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata a nivel de la corteza motora dorsolateral, anterior a la unión de la comisura blanca. En lado izquierdo, la zona lateral oscura delimita el núcleo isquémico, la zona con gris claro denota la penumbra isquémica en la corteza motora donde pueden persistir neuronas viables. Las regiones exofocales ipsilaterales y contralaterales de la corteza están en cuadrado con representación de las conexiones corticocorticales y corticoestriatales. Las neuronas de las láminas II/III hacen sinapsis corticocorticales con las neuronas ubicadas en estas láminas supragranulares del lado contralateral. Las proyecciones corticoestriatales se realizan desde neuronas piramidales de la lámina V.

5.6. BIOMARCADORES

5.6.1. PARVOALBÚMINA

Nuestro grupo de investigación tiene trabajos previos en la descripción y análisis del patrón de expresión de la proteína Parvoalbúmina (proteína atrapadora de calcio) tanto en regiones de penumbra como en regiones exofocales al foco isquémico en modelos en ratas. La expresión preferencial de Parvoalbúmina se encuentra en interneuronas gabaérgicas como las células en cesta y en candelabro, principalmente ubicadas en las láminas de la corteza cerebral II, III, V y VI. Su función inhibitoria ha sido descrito como de disparo-rápido por la alta velocidad con la que lograr inhibir circuitos excitatorios locales de neuronas piramidales

(44). Además, las interneuronas en forma de cesta hacen sinapsis en las regiones proximales del axón con mayor control de los potenciales de acción generados en zonas donde hay una mayor densidad de canales de sodio dependientes de voltaje. Las neuronas en forma de candelabro por otra parte pueden tener conexiones con otras interneuronas Parvoalbúminas + y activarse rápidamente ante un estímulo excitatorio local sin necesidad de una sinapsis directa con una neurona piramidal (44). Dado que estas interneuronas son uno de los principales blancos de las conexiones corticocorticales comisurales, la inmunorreactividad de Parvoalbúmina se encontró aumentada en estas mismas láminas corticales contralaterales en un estudio previo realizado por nuestro grupo con este modelo de isquemia cerebral. Creemos que es posible que exista un mecanismo compensatorio en respuesta al incremento de la excitabilidad del tejido al alterarse tanto las aferencias excitatorias desde el foco de la lesión y también del área de la penumbra isquémica (3). Al evaluar y comparar la expresión de las interneuronas positivas para Parvoalbúmina en diferentes regiones exofocales (pero con conexión con el foco isquémico) se podrá establecer si hay cambios en el número de interneuronas específicos para cada grupo experimental y si observar si estos conteos se correlacionan con los resultados de las pruebas neurológicas.

5.6.2. MAP2

Se ha descrito una disminución de la expresión de la proteína MAP2, considerada un marcador sensible a la lesión neuronal, pues se correlaciona esta disminución con alteraciones en el citoesqueleto somato-dendrítico neuronal, como retracción de espinas y cambios en la orientación del árbol dendrítico piramidal (1,43). Estos cambios se han observado tanto en trauma craneoencefálico en humanos (5) como en el daño isquémico posterior a la oclusión de ACM y puede observarse a partir de los primeros 30 minutos posteriores a la isquemia cerebral en áreas perilesionales como neocorteza, estriado, amígdala e hipocampo (43). Las isquemias por más de 120 minutos o permanentes llevan a un núcleo de infarto con leve atenuación de MAP2 en áreas perilesionales descritas. Como la proteína MAP2 está relacionada con la dinámica estructural del citoesqueleto neuronal, y por tanto con el mantenimiento de la estructura de la neurona y sus conexiones, cambios en su inmunorreactividad reflejan alteraciones en la integridad de las dendritas y subsecuentes modificaciones funcionales de los contactos sinápticos de las neuronas involucradas en las regiones específicas afectadas por la isquemia. Estas conexiones distantes pueden reflejar

cambios en la expresión de MAP2 en neuronas conectadas con el foco de lesión isquémica pero distantes a este.

5.6.3. GFAP

También hemos observado en estudios previos cambios en el patrón de expresión de un marcador contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína estructural de los filamentos intermedios (IF), usada como marcador específico de la glía que se utiliza desde hace más de 40 años por su utilidad para observar los procesos de los astrocitos y para el análisis cualitativo de la reactividad glial (45). Estos cambios astrocíticos se caracterizan por alteraciones específicas de su morfología y función celular como hipertrofia, proliferación celular y fibrillogénesis. En el SNC se ha descrito la presencia de GFAP en astrocitos ubicados en la sustancia gris y blanca, la glia radial del cerebelo y los astrocitos ubicados en los ventrículos (también se ha descrito en neuronas periféricas en el sistema nervioso entérico). GFAP suele aumentar su expresión después de diversas lesiones al sistema nervioso central como traumas, hipoxia, infecciones virales, intoxicación con alcohol. A este fenómeno se le llama Astrocitosis (46).

Algunos estudios encuentran que la sobreexpresión de GFAP después de una isquemia cerebral puede tener efectos protectores y otros, que pueden ser deletéreos. En los límites del foco de la lesión se observa una intensa reactividad glial con GFAP, especialmente por el aumento de astrocitos que la expresan y por la hipertrofia y el entrecruzamiento de sus procesos (46). De ser crónicos, estos cambios celulares pueden constituir la cicatriz glial, una causa de pérdida de la sinapsis durante los intentos de remodelación del tejido después de la lesión, con una gran liberación de mediadores proinflamatorios a nivel local. Sin embargo, la ablación genética de los astrocitos reactivos ha mostrado que estos también son importantes para contener la inflamación presente, posterior a la isquemia. En regiones remotas al sitio de la lesión se observan cambios gliales con leve hipertrofia del soma y de sus procesos, aunque en menor intensidad que alrededor del foco isquémico (47).

5.6.4. NeuN

Se ha utilizado NeuN desde hace dos décadas como marcador de neuronas en estado posmitótico en la corteza cerebral específicamente en las láminas II/III y V/VI. NeuN es antígeno que detecta principalmente núcleos de las neuronas. Recientemente se ha señalado a

la proteína Fox-3 como el objetivo neuronal del NeuN, una proteína que se expresa específicamente en todas las neuronas (48). Por este motivo este marcador tiene una relación específica con el tejido neuronal que nos permite diferenciar las neuronas de la glia. Se ha descrito previamente pérdida de la inmunoreactividad a Neun en las lesiones axonales, en hipoxia, isquemia cerebral y apoptosis (49). Se considera que la reducción en la reactividad y marcación de NeuN es un indicador de daño neuronal, incluso de muerte celular (6). En nuestro estudio, este conteo neuronal nos permite comparar las poblaciones en los lugares cercanos exofocales ipsilaterales y lejanos a la zona de la isquemia como el hemisferio contralateral y las zonas ya descritas en el estriado.

Biomodel	Strain	Ischemic focal or global	Time of ischemic/reperfusion	Neuroprotection	Postulated mechanism	Doses and route of administration	Metformin treatment time	Ref.
Rat	Wistar	Global	30 min/1 h	Yes	Reduction superoxide dismutase activity and glutathione peroxidase	500 mg/kg PO	One week before stroke	[57]
Rat	Sprague-Dawley	Focal	Not reperfusion	Yes	Suppression of the NF- κ B inflammatory pathway	50 mg/kg IP	3 weeks before stroke	[71]
Mice	C57BL/6N	Focal	60 min/72 h	Yes	Angiogenesis and improve cerebral dopaminergic tone	0,2 mL/kg IP 50 mg/kg/day IP	50 mg/kg/day beginning 24 h after stroke for 3 weeks	[72]
Rat	Sprague-Dawley	Focal	Not reperfusion	Yes	Induces autophagy	10 mg/kg/IP	Single dose 24 h before stroke	[73]
Mice	CD-1	Focal	90 min/14 days	Yes	Promotes neurogenesis and angiogenesis in subventricular zone	200 mg/kg IP	For 14 days after stroke	[74]
Rat	Goto-Kakizaki	Focal	90 min/14 days	Yes	Reduce levels of nitrotyrosine	300 mg/kg/day PO	For 14 days after stroke	[75]
Mice	C57BL/6N	Focal	3 min (IPC) at 72 hours 90 min/24 h	No	AMPK activation antagonizes neuroprotective effect of ischemic preconditioning	100 mg/kg IP	Single doses after stroke	[76]
Mice	CD-1	Focal	60 min/14 days	Yes	Favors change in phenotype M2 microglia/astrocyte	50 mg/kg/day IP	Beginning 24 h after stroke	[77]
Mice	C57BL/6	Focal	90 min/24 y 72 hours	No: acute treatment Yes: chronic treatment	In chronic treatment, less activation of AMPK	Acute: 50 a 100 mg/kg/día IP Chronic: 50 a 100 mg/k/day	Acute: 24 h before Chronic: 3 weeks before	[39]
Rat	Wistar	Global	30 min/72 h	Yes	AMPK activation inhibits apoptosis in hippocampal neurons	200 mg/kg/day PO	2 weeks before ischemia	[69]
Rat	Goto-Kakizaki	Focal	90 min/21 h	Yes	Reduced vascular remodeling and severity of hemorrhagic transformation in diabetes	300 mg/kg/day PO	Starting with the onset of diabetes	[67]
Rat	Wistar	Global	30 min/72 h	Yes	Attenuates cellular levels of NF- κ B and increased levels of Nrf2 in hippocampus	200 mg/kg/day PO	2 weeks before ischemia	[78]
Rat	Wistar	Global	30 min/72 h	Yes	Decreases reactive hyperemia and permeability of BBB in ischemic rats	200 mg/kg/day PO	2 weeks before ischemia	[62]
Mice	ddY	Focal	60 min/72 h	No: acute injection intraventricular Yes: chronic, IP	Central versus peripheral activation of AMPK	250 mg/kg/IP three times or 25,100 μ g ICV three times for day	After stroke until death	[35]
Rat	Goto-Kakizaki	Focal	90 min/14 days	Yes	Improved vascularization in diabetic group, achieve euglycemia	300 mg/kg/day PO	After stroke until death	[66]
Mice	C57BL/6	Focal	60 min/24 h	Yes	In seven-day pretreatment, less activation of AMPK	10 mg/kg/day IP	After stroke until death	[79]

Tabla 2. Estudios que han utilizado Metformina en los modelos animales de isquemia cerebral focal o global en roedores, con y sin reperusión. Tomado de Arbeláez I, Palacios M, 2017 (31).

6. JUSTIFICACIÓN

La investigación en neuroprotección ha tenido diferentes campos en los últimos años, muchos impulsados por el deseo y la necesidad de encontrar formas terapéuticas que ayuden a minimizar el daño secundario del tejido nervioso después de un accidente vascular dada la alta incidencia, mortalidad e incapacidad de estos eventos cerebrovasculares en los humanos. La metformina es un fármaco candidato que ha sido estudiado en el modelo de isquemia cerebral en ratas desde varias perspectivas de acción celular, con resultados positivos que se enmarcan en sus acciones neuroprotectoras. Aún quedan interrogantes relacionados con las diferencias de los efectos de la metformina posteriores a la isquemia del tejido cerebral y si estos son secundarios a sus acciones en la vasculatura (endotelio) o si son propiamente por acciones en las vías metabólicas de las neuronas. A la fecha, existe evidencia disponible del papel neuroprotector de la metformina en la isquemia cerebral en ratas y el mejor desempeño en los resultados de la escala neurológica que evalúa aspectos como movilidad de lado afectado y sensibilidad (especialmente con la escala modificada de Bederson y Garcia) y también en la ejecución de pruebas cognitivas y de memoria espacial utilizadas como las pruebas de laberinto en agua (27,28). Se requieren estudios adicionales que evalúen el pronóstico de la recuperación de la actividad motora con pruebas específicas de destrezas como la prueba del Beam walking test. Los hallazgos de mejoría del desempeño en pruebas de comportamiento se han asociado con una mejoría en los indicadores bioquímicos del metabolismo del tejido pero deben correlacionarse con el estado de las neuronas y sus conexiones. El modelo de isquemia en ratas es adecuado, utilizado por muchos investigadores en el campo, ya que puede simular en forma controlada los eventos isquémicos de la obstrucción de la arteria cerebral media. El conocimiento de la evolución del componente celular tanto neuronal como glial de las capas supragranulares e infragranulares de la corteza y el estriado puede dar cuenta del efecto neuroprotector de la metformina sobre las neuronas ubicadas en las regiones irrigadas por la arteria cerebral media y cambios en la expresión de diferentes marcadores relacionados con los resultados de la recuperación motora de los biomodelos. En este sentido, observar los cambios en la estructura celular de las neuronas ubicadas en la corteza cerebral motora exofocal al núcleo isquémico, donde la presión de perfusión cerebral no ha bajado a niveles críticos y no hay lesión por reperfusión, junto con las láminas que tienen proyecciones intra- e

interhemisféricas (ipsi y contralaterales) nos permitirá reconocer los cambios celulares netos independientes del componente vascular, que pueden tener un impacto (favorable o desfavorable) del uso de metformina previo o durante el evento isquémico. Esta información puede contribuir además en la caracterización de los efectos de la metformina como fármaco neuroprotector en el pronóstico clínico de los pacientes sobrevivientes a un accidente cerebrovascular.

7. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestro grupo de investigación se ha interesado desde sus inicios en la búsqueda de estrategias farmacológicas que puedan tener beneficios clínicos en pacientes que presentan accidentes cerebrovasculares o trauma craneoencefálico. Para esto hemos investigado en el pasado los efectos de la isquemia cerebral en regiones exofocales con el uso de marcadores neuronales como NeuN, Parvoalbúmina y GFAP entre otros. Creemos que para seguir adelante en la búsqueda de fármacos neuroprotectores, es indispensable avanzar en la caracterización de moléculas con probables efectos neuroprotectores y recopilar una gran cantidad de información concluyente que justifique esta nueva y deseada indicación terapéutica. Con el fármaco metformina se han realizado interesantes y numerosas investigaciones en esta línea de investigación neurológica que han dado luz sobre sus efectos celulares enmarcados en los accidentes cerebrovasculares isquémicos. Sin embargo aun quedan dudas sobre el nivel de acción de la metformina (vascular o neuronal o ambas). Un aspecto interesante en los modelos de isquemia en ratas ha sido la rápida recuperación neurológica de las ratas sobrevivientes, un mecanismo fisiológico propio de esta especie. Estos hechos suponen mecanismos rápidos para el reemplazo de las funciones cerebrales que se pierden con la muerte de las neuronas del núcleo de la lesión. Por esto es importante observar regiones distanciadas del foco de la lesión que en estas circunstancias podrían asumir nuevos roles secundarios a esta gran neuroplasticidad. Para esto consideramos que enfocarnos en observar la expresión de marcadores neuronales en zonas conectadas distantes del foco de la lesión nos permitirá responder la pregunta central de este estudio que es: ¿Los efectos neuroprotectores de la administración crónica de Metformina observados después de una isquemia cerebral focal transitoria en un modelo animal en roedores, tiene algún impacto sobre las poblaciones neuronales localizadas en el estriado y las láminas II/III, V/VI que puedan relacionarse con el desempeño de una prueba que evalúa la función motora?

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GENERAL

Valoración de los cambios celulares exofocales de la metformina suministrada crónicamente en un modelo de isquemia cerebral focal transitorio en ratas.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar el efecto de la metformina sobre el tamaño de infarto posterior a isquemia cerebral focal en ratas.

Describir los cambios celulares inducidos por la isquemia con perfusión en el foco y en regiones exofocales inducidos por el tratamiento crónico con metformina.

Discriminar los efectos en subpoblaciones neuronales en regiones exofocales inducidos por la isquemia y tratados con metformina.

Evaluar la reactividad glial alrededor del foco isquémico y en zonas corticales exofocales, entre los grupos con tratamiento y sin tratamiento de metformina.

Observar la preservación de las funciones neurológicas clínicas inducidos por la isquemia y tratados con metformina.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. MODELO ANIMAL

Estudio experimental, dos controles, simple ciego. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad del Valle. En todos los experimentos se usaron ratas wistar (suministradas por Bioterio Universidad del Valle) con peso estimado entre 250 a 350g, de 10 a 12 semanas de vida. Las ratas se mantuvieron en un ambiente controlado, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso constante a agua y comida durante todas las fases experimentales y procurando reducir su sufrimiento.

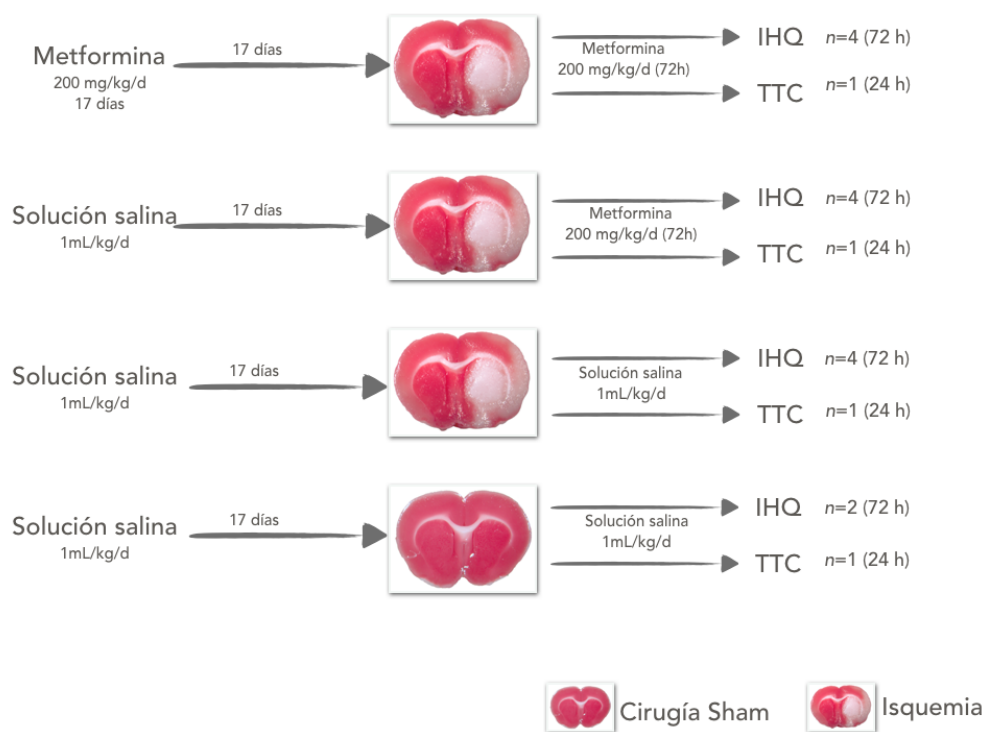


Figura 5. Diseño experimental y uso de biomodelos. IHQ: animales para análisis histológico mediante inmunohistoquímica. TTC: animales destinados para la cuantificación del infarto mediante la marcación con TTC. Sham: animales en los que se llevará a cabo el procedimiento quirúrgico requerido para la isquemia, pero no se realizará la obstrucción de la arteria cerebral media.

El número total de ratas intervenidas fue de 17 y se hizo bajo anestesia general con Isoflurano (ver detalles en descripción de cirugía), evitando su sufrimiento y siguiendo las normas antisépticas para los procedimientos invasivos; salvo por la dificultad de no tener acceso a un quirófano especializado, se garantizó la asepsia y antisepsia en el área donde se realizó el procedimiento. Se hizo seguimiento de la temperatura corporal y la frecuencia respiratoria de las ratas durante el procedimiento y una glucometría previa y durante cada intervención quirúrgica (Ver **Anexo 6**).

9.2. MODELO DE LESIÓN, ISQUEMIA FOCAL CON REPERFUSIÓN A LOS 90 MINUTOS.

Se utilizó el modelo de isquemia transitoria del territorio irrigado por la arteria cerebral media derecha en roedores diseñado inicialmente por Koizumi y modificado posteriormente por Longa en 1989 (50) el cual consiste en la introducción de un monofilamento por la arteria carótida externa hasta el nacimiento de la arteria cerebral media, retirándolo a los 90 minutos para garantizar isquemias con resultados más homogéneos a nivel de estriado, hipocampo y corteza motora dorsolateral (20).

9.3. ANESTESIA DURANTE PROCEDIMIENTO Y ANALGESIA EN EL POSOPERATORIO

Se utilizó Isoflurano como anestésico durante la inducción y el mantenimiento de la cirugía. Las propiedades farmacológicas de este anestésico volátil, permitieron una rápida inducción anestésica al introducir la rata en una cámara con un flujo de Isoflurano al 5% mezclado con oxígeno a 4 L/min.

El isoflurano produce una rápida inducción del estado anestésico y es utilizado en muchos grupos de investigación que tienen modelos de isquemia cerebral inducida en roedores. En la literatura existen reportes sobre acciones neuroprotectoras (51) y también sin interferencia en el tamaño del infarto ni en el edema cerebral secundario (51). Aunque se ha evidenciado que el efecto de este anestésico puede disminuir el potencial neuroprotector de un fármaco, su uso se justifica también por razones éticas y para una mejor manipulación de los biomodelos (52).

Para su suministro se utilizó una máquina de anestesia calibrada que permitió la mezcla y recirculación del anestésico con barrido de CO₂ por el filtro de óxido de calcio. Una vez la rata llegaba al estado anestésico completo, se pasaba a la cama quirúrgica donde se inmovilizaba en supino y se dejaba el Isoflurano entre 1,5 a 2% con modificaciones entre 1 al 2,5% de acuerdo al patrón respiratorio de la rata y el plano anestésico: Si se observaba bradipnea o signos de dificultad respiratoria (<40 por minuto) se disminuía hasta máximo 1,2% o se suspendía si no tenía una recuperación rápida. Si taquipnea (>70 por minuto) o signos de reactividad como movimiento de vibrisas, se aumentaba isofluorano hasta máximo 3,0%. El Isoflurano utilizado fue el fabricado y comercializado por Baxter en Colombia.



Figura 6. Equipo de anestesia utilizado. Se observa el vaporizador, la máquina de anestesia, la cámara de inducción y el filtro que captura las moléculas aisladas de isofluorano.

Para la analgesia posoperatoria se utilizó una dosis de tramadol a 5 mg/kg/dosis cada 4 a 6 horas, aplicado intraperitoneal durante las primeras 8 horas de la isquemia. Pasadas 12 horas del inicio de la isquemia, las ratas toleraban la vía oral por lo que se pasaba a analgesia vía oral con tramadol 0,1% en gotas 100mg/mL (una a dos gotas cada 4 a 6 horas).

9.4. SUMINISTRO DE METFORMINA EN SOLUCIÓN ESTÉRIL AL 6%

La metformina se diluyó en agua estéril, con un equipo especializado para garantizar la eliminación de microorganismos, proceso realizado en Tecnoquímicas S.A. La materia prima fue obtenida por donación de esta Compañía con los atributos de calidad como pureza del principio activo, no presencia de otros compuestos, que permitieron la fabricación de una solución estéril con la concentración del 6% (6g/100mL de metformina). Los viales entregados al grupo fueron refrigerados en nevera hasta su dispensación a 4°C (Figura 6).



Figura 7. Forma farmacéutica utilizada de Metformina. Viales de 20 mL que contienen metformina fabricados por Tecnoquímicas S.A. a una concentración de 6% (6g/100mL), estéril, con vidrio color ambár para proteger de la luz al principio activo. Estos viales se guardaron en nevera a 4 °C antes y durante su suministro a los grupos experimentales.

9.5. DOSIS Y ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA

La dosis utilizada de metformina fue de 200 mg/Kg/día durante 17 días antes de la cirugía y hasta por 72 horas después de esta. Se inició su suministro por gavage una vez la rata alcanzaba un peso aproximado entre 220 a 250g lo cual garantizaba que el peso el día de la isquemia no fuera superior a 350g. El suministro de la metformina requirió el uso de una cánula metálica especialmente acondicionada para evitar traumas esofágicos y asegurar la liberación de la metformina directamente en el estómago. Para su ejecución se inmovilizaba

en supino a la rata y se introducía la cánula lentamente (Figura 7). Este procedimiento se realizaba sin anestesia, con duración de 10 segundos, con la técnica adecuada para disminuir el estrés del animal.

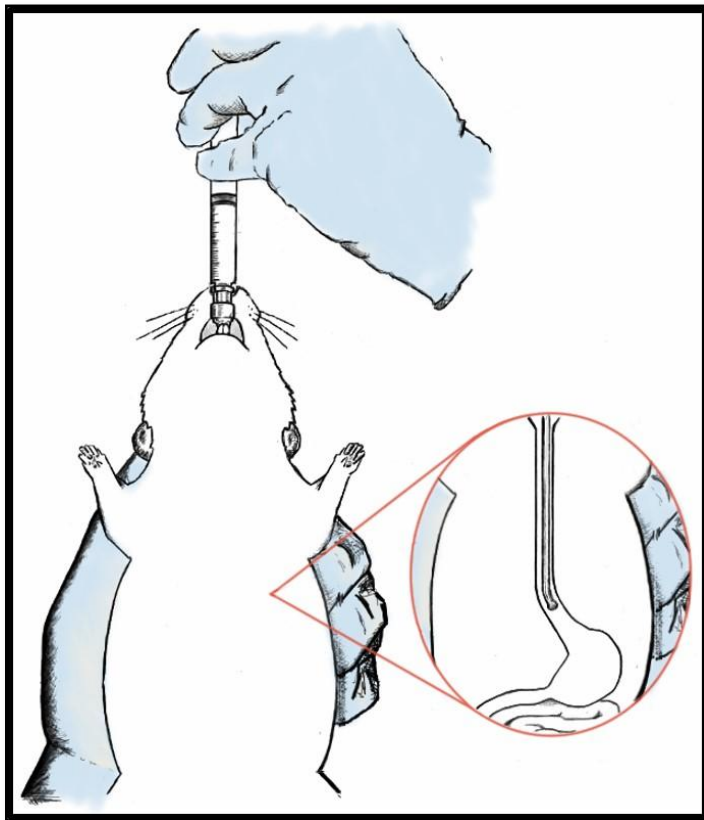


Figura 8. Técnica de Gavaje. En esta gráfica se observa el modo de inmovilizar la rata en supino desde la cabeza y se pasa suavemente y con rapidez la canula por el esófago. Este procedimiento demora menos de 10 segundos. No hubo complicaciones durante su realización.

El gavaje se realizó para asegurar el suministro del medicamento. A los controles se les dio solución salina estéril al 0,9% marca Baxter con el mismo procedimiento de gavaje ya descrito cada 24 horas.

9.6. ISQUEMIA CEREBRAL CON OCLUSIÓN DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA DERECHA

Inicialmente se realizó la inducción anestésica de las Ratas con Isoflurano a 5% más oxígeno 4L/min, como se menciona en el apartado de anestesia. Se requirió de un

microscopio estereotáxico (figura 9) para realizar la microcirugía que se describe a continuación.

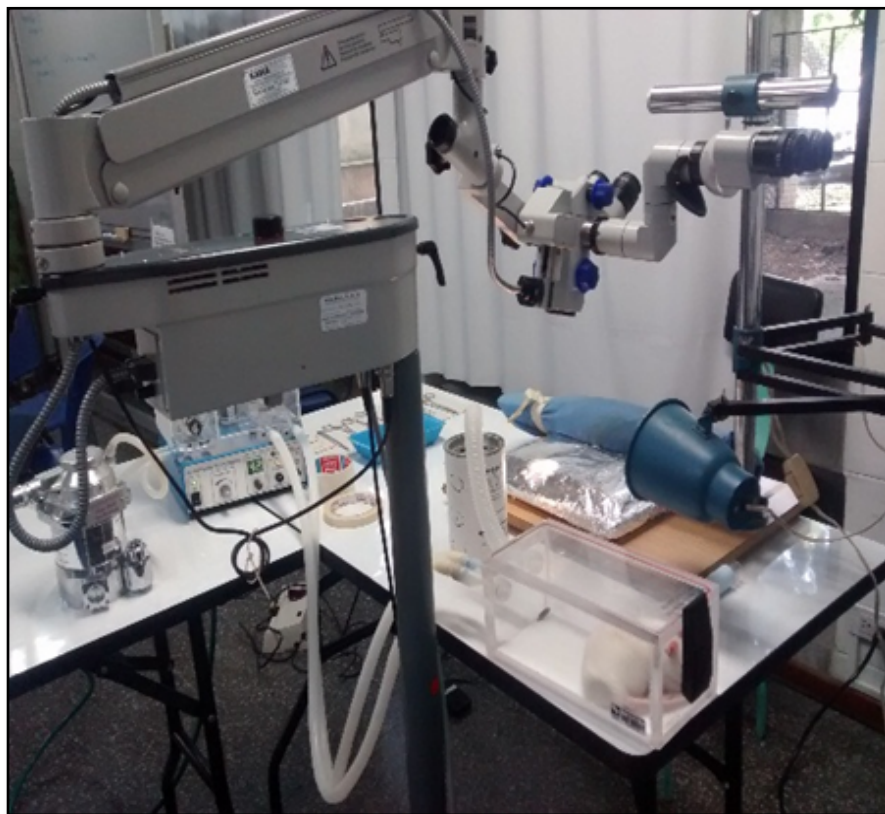


Figura 9. Quirófano utilizado para la realización de inducción de isquemia cerebral. Se utilizó microscopio estereotáxico, material quirúrgico para microcirugía, una lámpara de calor radiante para mantener eutérmicas las ratas durante el procedimiento. Estos procedimientos se realizaron en el quirófano de práctica quirúrgica de la Universidad del Valle y contaron con el aval del comité de ética animal de la Universidad del Valle.

Una vez la rata era inducida a un estado anestésico completo en la cámara de inducción, se pasaba a la cama quirúrgica donde se aplicaba ungüento ocular (para proteger la córnea de la deshidratación por no parpadeo). A nivel de cuello se afeitaba con cuchilla y uso de jabón yodado y posteriormente se realizaba la incisión quirúrgica, de aproximadamente 2 a 3 cm, siguiendo la línea media del cuello de la rata, un (1) mm hacia la derecha, seguida de la disección por planos hasta exponer la arteria carótida común y su bifurcación en la carótida externa e interna (figura 9 y 10).

Sobre la arteria carótida común se dejaba un separador para su fácil ubicación. Posteriormente se realizaba la disección de la arteria carótida interna hasta el origen de la arteria pterigopalatina. Las dos ramas iniciales de la carótida externa eran cauterizadas (la arteria Occipital y la arteria tiroidea superior) para evitar sangrados posteriores durante la introducción del monofilamento (53).



Figura 10. Plano muscular para acceder a la arteria carótida. Esquema del abordaje quirúrgico de la arteria carótida común y su bifurcación en carótida interna y externa. La incisión quirúrgica se practicaba a 1 mm de la línea mediana en el cuello. El tejido glandular se disecaba con cuidado y se mantenía dentro de la herida quirúrgica para evitar su desecación y necrosis. Se describen los tres músculos del trigono muscular que permite encontrar el acceso a la bifurcación de la carótida común. Sólo una rata se encontró con una anatomía vascular diferente a la reportada. (*, arteria carótida común). 1. Músculo Digástrico (se reconoce por una porción de su fascia que es brillante). 2. Músculo esternohiideo. 3. Músculo Esternomastoideo.

Se ligó la arteria carótida externa con sutura Prolene 5-0 lo más distal y cefálico posible para ofrecer el mayor espacio disponible para hacer la arteriotomía sobre la carótida externa, a aproximadamente 0,1 a 1 cm de la bifurcación carotídea. Para causar la isquemia cerebral se utilizó un monofilamento de nylon estéril (Doccol Corporation) de diámetro 4-0, con una cubierta de silicona de 1 mm de largo para mejorar el sellado con la luz del vaso. El nylon se

introduce desde el muñón u orificio de la carótida externa para alcanzar la carótida interna. Previamente se colocaron clamps en la arteria carótida común y arteria carótida interna para evitar sangrado en la arteriotomía (Figura 10 y 11).

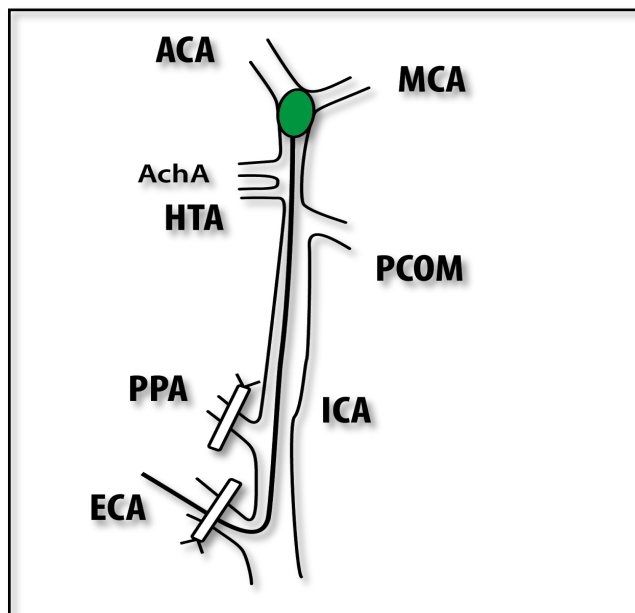


Figura 11. Ramas de la arteria carótida interna y sitio de introducción del monofilamento hasta el origen de la arteria cerebral media. Una vez se disea la arteria carótida externa, se introduce el monofilamento y se asciende hasta el origen de la ACM y se fija con un nudo en el muñón de la carótida externa. ECA: Arteria carótida externa. PPA: Arteria pterigopalatina. ICA: Arteria Carótida interna. PCOM: Arteria comunicante posterior. AchA: Arteria corioidea anterior. MCA: Arteria cerebral media. ACA: Arteria cerebral anterior.

Sobre la bifurcación carotídea en el lado de la ACE se coloca una sutura sin apretar para permitir el paso del monofilamento y una vez este ingresa a la carótida común (inicialmente), se ajusta con un doble nudo para evitar el sangrado masivo cuando se retiren los clamps (para permitir el paso del monofilamento hacia el polígono de Willys). Una vez se orienta el monofilamento por la carótida interna, se lleva hasta la altura calculada para la obstrucción de la arteria cerebral media (aproximadamente 18 mm desde el sitio de introducción del monofilamento para ratas entre 250g a 280g, 19 mm para ratas con peso > 280g, 19,5 mm para ratas >300g) (53). La sutura se dejó fija en el sitio durante 90 minutos, tiempo en que la rata permaneció anestesiada y en posición supino. Se cerró la herida quirúrgica durante el tiempo de la isquemia. Pasados los 90 minutos, se retiró nuevamente el monofilamento con

cuidado para evitar sangrado masivo por la arteriotomía. Por la duración de la isquemia este se considera un modelo sin reperusión. La incisión del cuello se cerró utilizando una sutura de seda 3-0 y se aplicó anestésico local (lidocaina gel). En los animales control (Sham) se realizó el procedimiento de anestesia e incisión quirúrgica, disección por planos hasta llegar a las arterias carótidas pero no se introdujo la sutura intravascular. La duración de la inducción de la isquemia demoró entre 45 a 60 minutos. La oclusión de la ACM se realizó en el hemisferio derecho. En **Anexo 6** se encuentran las variables seguidas durante el procedimiento quirúrgico.

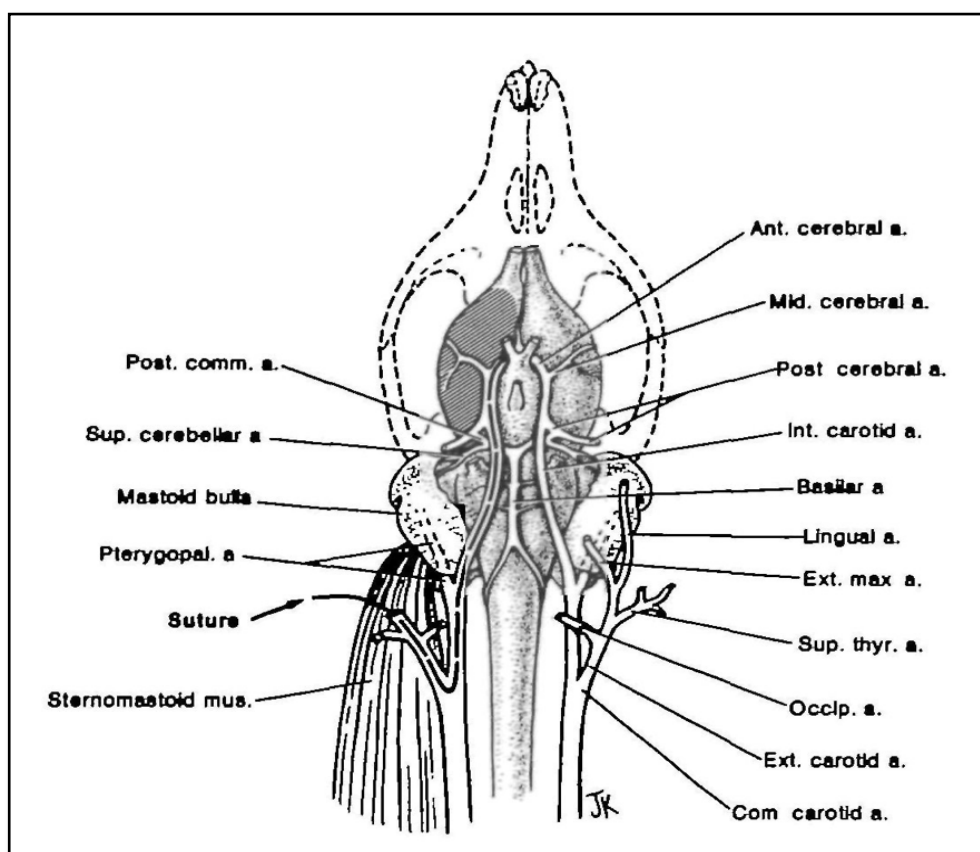


Figura 12. Representación esquemática de inserción del monofilamento dentro de la arteria carótida externa (ECA). Tomado de Longa et al, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, Stroke, 1989;20:84-91

Durante la realización del procedimiento se hizo seguimiento a la temperatura corporal para evitar la hipotermia ya que esta confiere neuroprotección sobre el cerebro y también durante las dos primeras horas de reperfusión ya que la hipertermia espontánea es una complicación asociada a una lesión hipotalámica. Se obtuvo también una glucometría aprox. 30 min de inicio del procedimiento quirúrgico.

9.7. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS PARA EL ANÁLISIS

Para el análisis histológico se usaron los tejidos cerebrales 72 horas postisquemia (Figura 12). Este procedimiento requirió la anestesia con isoflurano del biomodelo y posterior perfusión con solución salina al 0.9% entre 200 cc hasta 300 cc y perfusión con 250 cc de paraformaldehído (PLP). La extracción del cerebro se realizó en aproximadamente un minuto para cada cerebro con precaución de no lesionar la corteza durante la manipulación del tejido.



Figura 13. Línea del tiempo de los procedimientos realizados. El día cero comenzaba cuando las ratas llegaban a un peso entre 230 a 250 g. Tres días antes de la isquemia cerebral se comenzaba el entrenamiento en la prueba de balance en la barra. Esta prueba fue filmada 24 horas antes (día 16) y 72 horas después (día 20) de la isquemia cerebral. El día 16, 18 (a las 24 horas de la inducción de la isquemia cerebral) y 20 se realizaba una evaluación neurológica.

A las 72 horas posteriores a la isquemia se tomaron las muestras del parénquima cerebral. El periodo seleccionado permitió observar los cambios en la síntesis y/o activación de proteínas, en el área isquémica con el uso de marcadores como Neun, MAP2 y Parvoalbúmina (49). TTC se realizó a las 24 horas (54).

9.8. PERFUSIÓN Y CONSERVACIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

El sacrificio de las ratas se hizo bajo anestesia general para la posterior perfusión transcárdica utilizando como fijador PLP (paraformaldehído al 4%) (55). Para esto se realizó una incisión en el apéndice subxifoideo para acceder a la cavidad abdominal inicialmente y posterior a la disección del diafragma, y el acceso a la cavidad torácica. Se retiró el tejido conectivo alrededor del corazón (este debe estar latiendo) y se insertó con cuidado una aguja con punta roma calibre No. 18 en el ventrículo izquierdo y se avanzó hasta la aorta. Se realizó un corte en la aurícula derecha y se perfundió con solución salina al 0,9% por el ventrículo izquierdo a unos 100 mmHg (entre 200 a 250 mL) hasta que el fluido drenado por la aurícula derecha se tornó claro. Luego se cambió el fluido de solución salina por el de la solución fijadora PLP de Paraformaldehído, L-lisina, Meta-Periodato de Sodio, en buffer fosfato salino, pH 7.4, a 4° C (entre 200 a 250 mL).

Después de extraer y lavar el cerebro con solución salina isotónica, se continuó la fijación por inmersión durante 48 horas adicionales con la misma mezcla del fijador. Después se deshidrataron los tejidos con inmersión en sucrosa al 30% por 48 horas con recambio a las 24 primeras.

Finalmente, se congelaron los tejidos con isopentano enfriado con hielo seco y se almacenaron a -70 °C hasta ser cortados en criostato.

9.9. ESTIMACIÓN DE LA PROPORCIÓN DEL ÁREA INFARTADA CON EL USO DE TTC

Se realizó la cuantificación del infarto con la marcación con TTC en cada grupo (24 horas) a una rata por grupo (n=3), y las 4 restantes se utilizaron para las pruebas de inmunohistoquímica. En total se realizaron 2 ratas Sham. Para la evaluación neurológica se utilizaron 4 ratas por grupo (n=12).

Existen varias técnicas disponibles en la actualidad para determinar macroscópicamente el tejido viable del infartado (53). Para la determinación de TTC una vez se haya realizado el proceso de fijación de cortes coronales de 2 mm grosor de la corteza que incluyan la región dorsolateral de la transición frontoparietal, utilizando como referencia la comisura blanca anterior, la región hipotalámica anterior y el estriado según las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos-Watson ya descritas (43).

Después de obtener los cortes coronales en las coordenadas relativas al foco isquémico de la ACM, se sumergieron en TTC al 0,5% en PBS al 0,2 molar a 37 °C por 15 min. Posteriormente los cortes se montaron en papel milimetrado y se obtuvieron fotos digitales para el análisis del tamaño de la lesión. Con esta técnica las áreas infartadas no se marcan y permanecen pálidas lo que permitió una fácil demarcación de esta área. El volumen de la lesión sin corregir es la suma de todas las áreas multiplicado por el grosor de los cortes. Como el edema cerebral secundario puede sobreestimar el volumen del infarto, este se corrigió al restar el área normal de tejido en el hemisferio ipsilateral del área total del hemisferio contralateral. Al multiplicar el área corregida por el grosor de los cortes y la suma de todos los cortes obtenidos da el volumen del área infartada corregida.^{29, 32}

9.10. USO DE CRIOSTATO PARA OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Los cerebros congelados fueron cortados en el criostato con un grosor de 30 micras. Para esto se utilizó el criostato del área de Morfología. Los cerebros se marcaron en el lado no isquémico (contralateral) hacia la región ventral para poder reconocer la orientación del tejido posterior a la inmunohistoquímica. Los cortes se realizaron en región dorsolateral, desde la aparición del cuerpo calloso (anterior) hasta la aparición de la comisura blanca anterior (posterior). Cada corte se ubicó en el atlas de paxinos (ver resultados). Los cortes se guardaron en 3 mL de solución anticongelante con 3 a 5 cortes por pozo aproximadamente. Las cajas se dividieron en pozos anteriores (desde A1 hasta B6) y cortes posteriores hipocámpales (desde C1 hasta D6). Ver Anexo 3.

Los cortes cerebrales obtenidos se clasificaron según el Atlas anatómico de Paxinos para coordenadas cerebrales de la región motora de la rata, porción dorsolateral, hasta la aparición de la comisura blanca anterior.

9.11. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron cortes coronales del tejido congelado en criostato con 30 µm de espesor y se procesaron en pozo durante libre flotamiento en PBS. Los cortes se hicieron seriados para luego ser procesados de forma consecutiva con los anticuerpos primarios de interés mediante inmunohistoquímica.

Todas las soluciones de anticuerpos y sueros de bloqueo se prepararon en Buffer Fosfato Salino (PBS, por sus siglas en inglés) con pH de 7,4; solución que también fue utilizada para realizar los lavados (3 lavados cada uno de 5 minutos) de los reactivos, entre un paso y otro de la inmunohistoquímica. Inicialmente las secciones de tejido se sumergieron en una solución de metanol (al 30%) y peróxido de hidrógeno (al 0,3%) durante 12 minutos, luego se bloquearon con la adhesión de antígenos específicos con suero normal de caballo (Vectastain Elite ABC, PK-6102 Mouse IgG→, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA) al 1,5% durante 40 minutos. Después se incubaron los cortes por 18 horas en los anticuerpos Anti-MAP2 en una dilución de 1:100, Anti-NeuN en una dilución de 1:2500, Anti-GFAP diluido 1:400 y Anti-Parvoalbúmina diluido 1:5000. Acto seguido se agregó el complejo Avidina/Biotina (Vectastain Elite ABC, PK-6102 Mouse IgG→, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA) durante 40 minutos. Finalmente, se adicionó una solución que contiene Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% en PBS (Peroxidase Substrate Kit, DAB SK-4100→, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA). Como controles negativos del procedimiento, algunos cortes serán procesados de la manera arriba descrita pero omitiendo agregar el anticuerpo primario.

Terminada la inmunomarcación, los cortes se montaron en láminas portaobjetos previamente cromoaduminadas, secados a temperatura ambiente, lavados para eliminar los excesos de sal del buffer. Se deshidrataron progresivamente en alcoholes y xiloles, y finalmente se cubrieron con un medio de montaje (Fisher Permount Mounting Media) y laminillas cubreobjetos.

9.12. EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL DE LOS BIOMODELOS

La evaluación comportamental se llevó a cabo por medio de dos escalas neurológicas, las escalas de Bederson y García y una prueba motora fina, el “Beam walking test”. La escala de Bederson fue desarrollada en 1995 y evalúa la flexión de las extremidades anteriores, movimiento circular y resistencia al empuje, dando una calificación de 0 ó 1 a cada ítem,

siendo 0 sin déficit, 1 con déficit neurológico. La escala de García evalúa 6 aspectos de la función motora y sensorial de la rata: actividad espontánea, simetría en el movimiento de las cuatro patas, extensión, agarre, propiocepción y vibrisas. En el Anexo 1 se detalla el examen neurológico para cada examen. Ambas escalas fueron evaluadas antes de la cirugía, a las 24 h y a las 72 h, siguiendo los protocolos descritos desde 1995 (56).

Para completar el abordaje de la evaluación neurológica de los biomodelos, se valoraron las pruebas de función motora fina y el balance según lo descrito para el arreglo del “Beam Walking Balance Test” (57). El “Beam walking test”, también conocido como “Beam balance” es una prueba que evalúa la función motora fina y el balance y consiste en que la rata atraviese una viga de madera de 1 cm de espesor, desde un extremo hostil e incómodo, iluminado con una lámpara, hacia un extremo agradable, ambientado con una caja oscura con comida y un lecho (Figura 14). Se cronometró (y se filmó) el tiempo que la rata tardó en atravesar 1 metro de longitud por la viga. Los datos se encuentran en el Anexo 2.

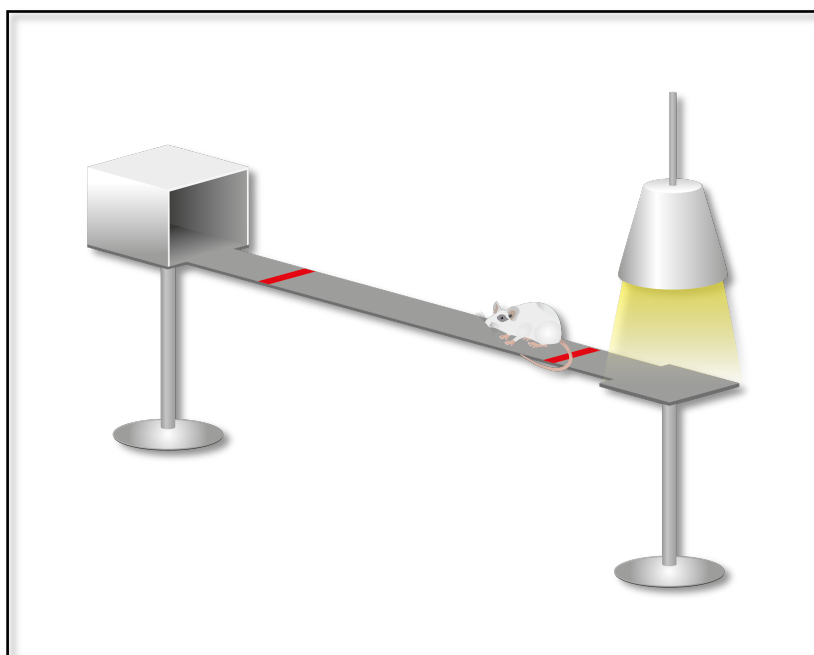


Figura 14. Prueba del Beam Walking Test. La rata pasa de un extremo hostil (iluminado e incómodo) hasta un espacio-refugio oscuro con comida al pasar por una barra de un metro de largo que le exige mantener el equilibrio/balance. La gráfica no está a escala y muestra una barra más ancha de la utilizada (ancho real de la barra es de un cm).

Para realizar esta prueba, se realizó un entrenamiento previo de las ratas, durante 3 días consecutivos, 3 intentos por día. Las ratas eran transportadas fuera del bioterio por lo que en cada entrenamiento se dejaron las ratas 10 min en el lugar donde se realizaba el Beam walking para disminuir el estrés de la prueba y favorecer la adaptación a un nuevo ambiente. Al comenzar los primeros intentos, para estimular el paso de los animales por la viga se utilizó un trozo de comida y en algunos casos se empujó al biomodelo o se le sostuvo de la cola para dar equilibrio. Si aún así no atravesaba la viga, se tomó la rata y se le mostró el camino que debía seguir. Posteriormente se colocó el biomodelo en el otro extremo de la viga, el confortable, y se esperaba al siguiente intento. Una vez la rata se encontraba en la caja con el lecho se contabilizó un minuto, durante el cual la rata hizo el reconocimiento del espacio y se retiraba de este cuando terminaba tiempo. Al finalizar cada intento, la viga se limpió con papel servilleta, para evitar que el olor de otros animales, afectara o sesgara el intento de la rata siguiente. Fue común observar que al inicio de los entrenamientos las ratas eran incapaces de pasar y después de tres intentos, aprendían a hacerlo con agilidad. En el día número 4 se llevó a cabo la evaluación de la prueba, un día antes de la cirugía y a las 72 horas después de la isquemia, antes de la extracción del tejido nervioso.

Se realizó análisis cuantitativo para el marcador neuronal NeuN y para interneuronas positivas para parvoalbúmina. Este conteo se hizo en la ipsilateral exofocal a la isquemia (derecho), contralateral exofocal y en el estriado (ventromedial y dorsolateral). Para esto, se tomaron fotos con equipo de alta resolución en láminas II/III y V/VI de la corteza motora de la rata (ver Figura 15) y estriado región ventromedial y dorsolateral, se identificaron las láminas en la corteza motora y se realizó el conteo de neuronas en un cuadrante de 250 micras por 250 micras. Esto también se realizó en el cuadrante superoexterno e inferomedial en el estriado ipsi y contralateral respectivamente.

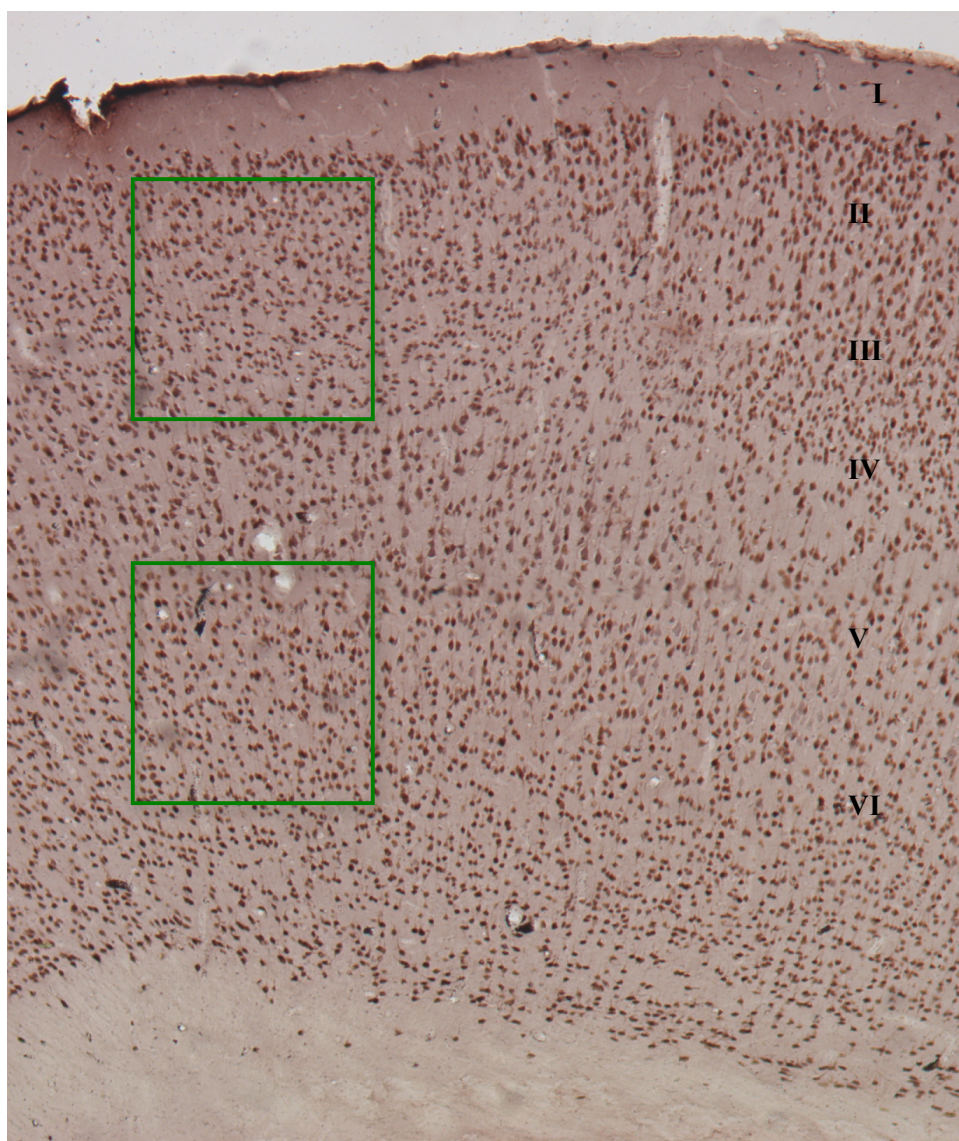


Figura 15. Imagen de la corteza motora marcada con NeuN y con la señalización del área donde se realizaron los conteos neuronales. Los cuadrantes en verde se ajustaron para un área de 250 x 250 micras donde se realizaron los conteos de neuronas entre los diferentes grupos en las láminas II/III y V/VI de la corteza cerebral motora. Idénticos cuadrantes se utilizaron para conteo en el estriado. A la derecha, en números romanos se describen las láminas de la corteza cerebral. Foto 10x

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos de conteos de neuronas se expresaron con media y la desviación estándar estimada para cada experimento, esto incluye los resultados obtenidos para las pruebas de inmunohistoquímica y la prueba de Beam walking test. Para la comparación entre los grupos se analizaron los resultados por el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) por la necesidad de tener varios factores que pueden influir en los resultados (tratamiento, hemisferio y lámina cerebral) considerando *a priori* una $p < 0,05$ como indicador de significancia estadística del resultado. Sólo se analizaron los resultados que tuvieron una distribución normal. Se usó el software GraphPad para el análisis y la realización de las gráficas. Los resultados de las pruebas neurológicas (García y Bederson) no se analizaron con esta estadística.

Para los dos marcadores NeuN y Parvoalbúmina se tienen los mismos factores, niveles y tratamientos, descritos a continuación:

10.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y VALIDACIÓN DE SUPUESTOS

Tabla 3. Resultados para diferentes factores como fuentes de variación: Anova

Fuente de Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	27387	9128,9	17,28	0,000
Hemisferio	1	9847	9846,7	18,64	0,000
Lámina cerebral	4	70339	17584,8	33,29	0,000
Tratamiento*Corteza	3	3626	1208,8	2,29	*0,090
Tratamiento*Lámina(Corteza)	12	16811	1400,9	2,65	0,008
Error	48	25355	528,2		
Total	71	153364			

Con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, hemisferios, láminas de corteza. Además hay presencia de normalidad e independencia de

los residuales.

10.2. ANOVA PARA PARVOALBÚMINA

Los resultados generales del análisis del conteo para interneuronas parvoalbúminas positivas no arrojaron significancia estadística al comparar todas las fuentes de variación entre los grupos. Sin embargo, existen diferencias significativas entre el efecto de la lámina anidada al hemisferio, el tratamiento interactuado con el hemisferio y el hemisferio de forma individual, sobre el número de neuronas vivas

Tabla 4. Resultados del análisis estadístico del conteo de interneuronas en el estriado con el uso de GraphPad. Se muestran los resultados obtenidos directamente del software en Excel. Los datos completos para cada comparación entre grupos se encuentran en el Anexo 7.

Table Analyzed	Parvoalbumina estriado				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
			P	value	
Source of Variation	% of total variation	P value	summary	Significant?	
Interaction	3,953	0,4718	ns	No	
Row Factor	8,639	0,0219	*	Yes	
Hemisferio	5,509	0,3236	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
				F (3, 52) =	
Interaction	15	3	4,999	0,8521	P = 0,4718
				F (1, 52) =	
Row Factor	32,77	1	32,77	5,586	P = 0,0219
				F (3, 52) =	
Hemisferio	20,9	3	6,965	1,187	P = 0,3236
Residual	305	52	5,866		
Number of missing values	4				

10.3. ANOVA CONTEO NEURONAS CON NeuN, ESTRIADO

Hubo diferencias significativas entre los grupos (tratamiento) y el hemisferio de los grupos experimentales en los conteos de neuronas con NeuN. Los datos se presentan exportados a una matriz de excel desde el GraphPad. El análisis completo entre los diferentes grupos se encuentra en el **Anexo 7**.

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico del conteo de neuronas en el estriado con el uso de GraphPad. Se muestran los resultados obtenidos directamente del software en Excel. Los datos completos para cada comparación entre grupos se encuentran en el Anexo 7.

Table Analyzed	NeuN estriado				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	15,56	0,003	**	Yes	
Row Factor	13,11	0,0006	***	Yes	
Hemisferio	24,96	0,0001	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	20550	3	6850	F (3, 49) = 5,306	P = 0,0030
Row Factor	17319	1	17319	F (1, 49) = 13,42	P = 0,0006
Hemisferio	32979	3	10993	F (3, 49) = 8,516	P = 0,0001
Residual	63252	49	1291		
Number of missing values	15				

No se realizó análisis estadístico a los resultados de las pruebas de evaluación neurológica por no tener distribución normal.

11.RESULTADOS

11.1. VALORACIÓN DEL TAMAÑO DEL INFARTO. USO DE TTC

Se determinaron los valores de las áreas isquémicas con el uso de TTC (descrito en la Metodología) y se tuvo en cuenta la determinación del área isquémica corregida para evitar aumentar los porcentajes del volumen final infartado en el lado ipsilateral secundario a edema cerebral (ver figura 16).

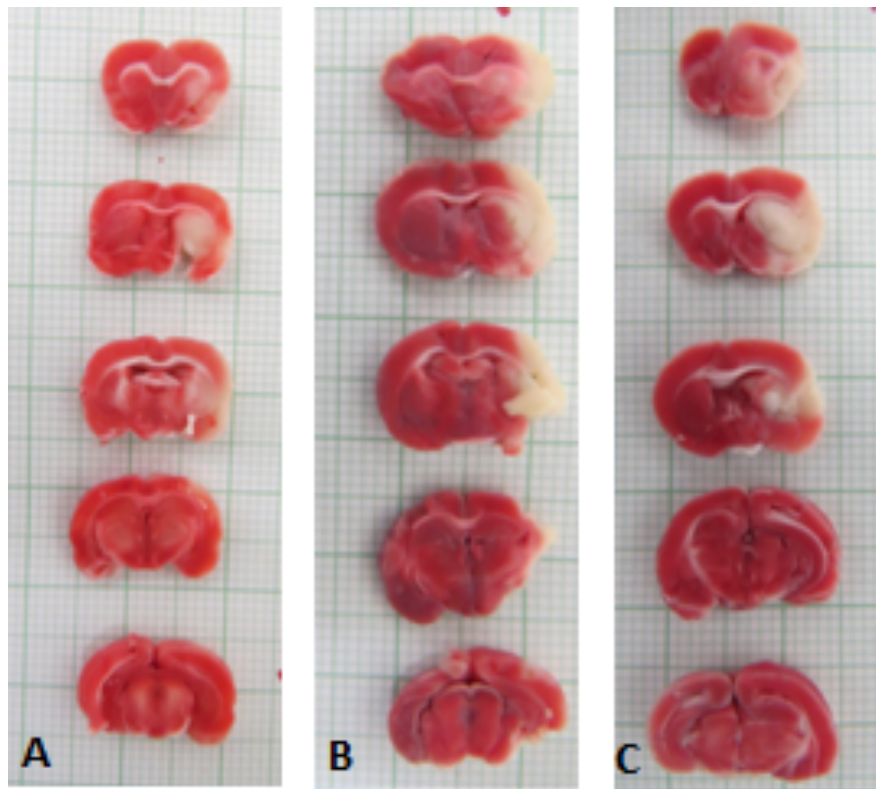


Figura 16. Tinción de cortes coronales de cerebro isquémico de rata Wistar con TTC. Cada corte coronal tiene un grosor aproximado de 2 mm, obtenidos 24 horas posterior a la inducción de la isquemia del territorio de la arteria cerebral media. Estos cortes se dejaron en TTC al 0,5% por 15 min a 37 °C. La región pálida señala las áreas isquémicas en el hemisferio derecho para cada grupo. **A.** Grupo Metformina Post. **B.** Grupo Solución Salina. **C.** Grupo Metformina Pre.

Los resultados del área estimada en cm^2 para cada corte de cerebro y la corrección estimada (al descartar el efecto del edema cerebral en lado isquémico) se consignan en la Tabla 6. Se evidencia reducción del volumen del infarto en el grupo que uso Metformina pre, por dos semanas previas a la isquemia cerebral.

Tabla 6. Resultados de la estimación del área isquémica corregida en cada corte coronal y el volumen total del infarto en cada grupo experimental. Se determinó el área de isquemia en cortes cerebrales y su volumen al multiplicar por el grosor de cada corte coronal (2 mm).

Grupo/Cortes cerebrales	Área Normal Ipsilateral mm^2	Área Contralateral mm^2	Área isquemia corregida mm^2	Volumen en cada corte coronal del infarto mm^3
Metformina post-1	32,9	44,92	12,02	24,04
Metformina post-2	29,3	55,26	25,96	51,92
Metformina post-3	40,78	66,2	25,42	50,84
Metformina post-4	49,74	63,05	13,31	26,62
Volumen total del infarto en mm^3 Metformina post				153,42
Metformina pre-1	25,5	32,58	7,08	14,16
Metformina pre-2	27,87	46,55	18,68	37,36
Metformina pre-3	49,5	60,11	10,61	21,22
Metformina pre-4	73,81	60,94	5,77	11,54
Volumen total del infarto en mm^3 Metformina pre				84,28
Solución salina-1	23,9	39,45	15,55	31,1
Solución salina-2	28,67	53,02	24,35	48,7
Solución salina-3	33,07	61,07	28	56
Solución salina-4	36,43	60,94	24,51	49,02
Volumen total del infarto en mm^3 Solución Salina				184,82

11.2. RESULTADOS CUALITATIVOS

La descripción de las dendritas apicales de las neuronas ubicadas en la corteza cerebral se enfocó en la descripción de la integridad y cambios en el patrón de intensidad con el uso del marcador MAP2. También se observaron los cambios en las células gliales como los astrocitos ubicados principalmente en la lámina I/II y V/VI de la corteza cerebral bilateral. Los resultados en la parte cualitativa están expresados en diagramas de frecuencias para cada una de las variables observadas en los cortes. El análisis descriptivo se basa principalmente en los resultados de las frecuencias de las variables consideradas más importantes (Intensidad e integridad) en el caso de MAP2, y en el caso de GAPF presencia de hipertrofia y conteo (número de células presentes al comparar con el grupo control), además de cambios en la intensidad.

11.3. VALORACIÓN CUALITATIVA DE LAS DENDRITAS DE LÁMINAS DE CORTEZA CEREBRAL MOTORA. USO DE MAP2

Se hizo una valoración descriptiva de los cambios observables de las dendritas apicales ubicadas en la corteza cerebral motora de regiones exofocales contralaterales. Como ya se ha descrito, se utilizó el marcador MAP2 con una comparación cualitativa de acuerdo a los valores obtenidos con el grupo control no experimental (Sham). Para la obtención de las imágenes fotográficas se utilizó el mismo filtro e intensidad de luz para su observación. En la figura 17 y 18 se observa un patrón de alta e intermedia intensidad. La integridad se definió de acuerdo a la presencia de microfilamentos observables no fragmentados ni con otras formas (entorchados) asociados a compromiso de estos.

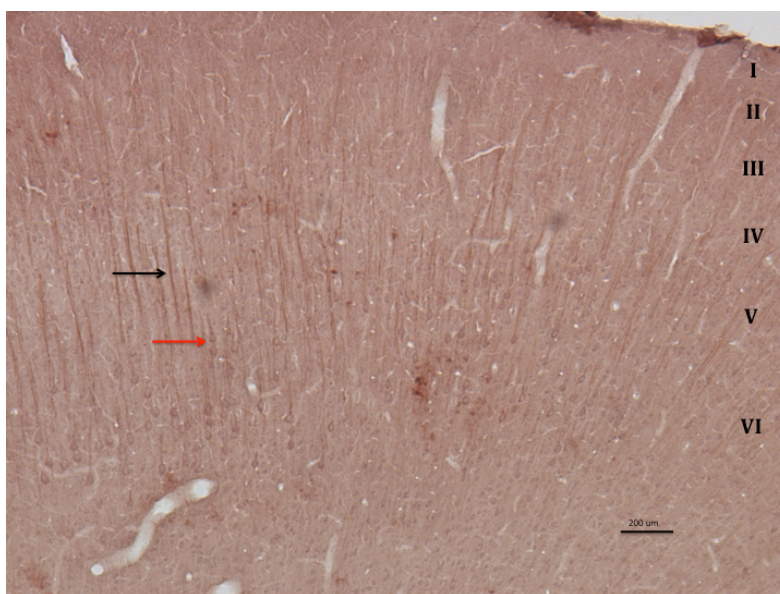


Figura 17. Corte coronal de la corteza motora cerebral contralateral a la lesión isquémica, con inmunohistoquímica para MAP2, Grupo Sham. Se observan las dendritas apicales entre las láminas II a V (flecha negra) y algunos somas marcados (flecha roja) de neuronas ubicadas entre láminas IV a VI, sin deformidad ni alteraciones, con una intensidad media. Foto 10x

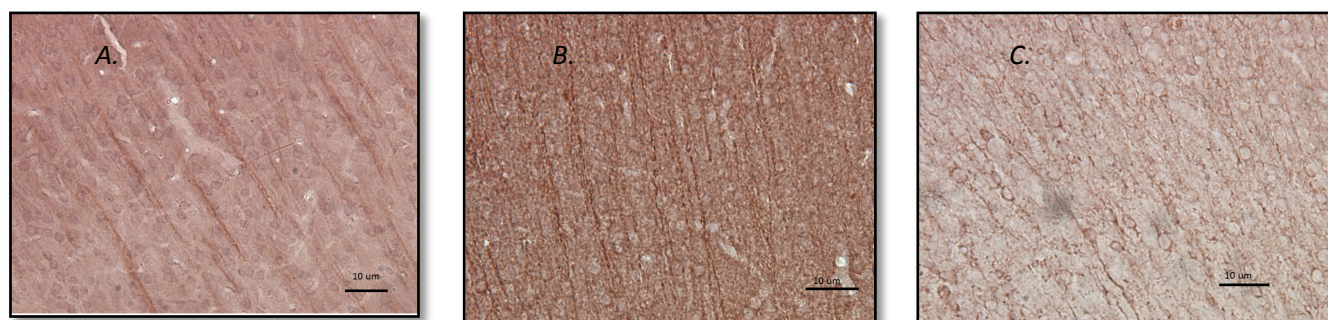


Figura 18. Fotografía microfilamentos contenidos en dendritas corteza cerebral con el uso de marcador MAP2 con diferente intensidad. **A.** Se observa microfilamentos de dendritas apicales en la corteza cerebral de la rata Sham con patrón de Intensidad alta y buena integridad de los microfilamentos contenidos en las dendritas de neuronas de corteza motora a nivel de láminas II-III. **B.** Se observa leve pérdida de integridad en corte de Grupo metformina Pre, contralateral con patrón de intensidad intermedia. **C.** Se observa pérdida de la integridad de dendritas con intensidad baja en la marcación en el grupo solución salina contralateral. Se observan también los somas de algunas neuronas. Foto 40x

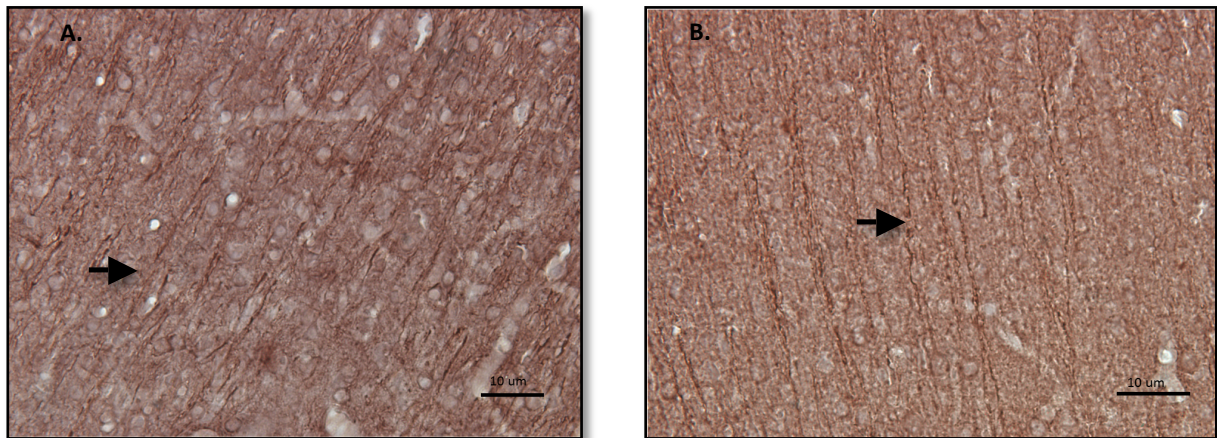


Figura 19. Fotografía de las dendritas apicales marcadas con MAP2 en grupos experimentales. A. Cambios en las dendritas apicales del grupo solución salina en intensidad y alteración de la integridad (fragmentación, flechas) y B. Cambios similares, en el grupo metformina pre, 72 horas posterior a la isquemia cerebral ipsilateral exofocal. Se observa también pérdida de la marcación de cuerpos neuronales en láminas IV/V y reducción en la intensidad de la marcación para MAP2 en ambos grupos. Foto 40x.

Al determinar la intensidad en los cortes con el inmunomarcador para MAP2, se observó que la intensidad media (o intermedia) fue la más frecuente en todos los grupos excepto para el grupo experimental que usó metformina por 72 horas posterior a la isquemia cerebral en ambos hemisferios. En la Figura 20 y 21 se describen los resultados descriptivos promediados por grupo.

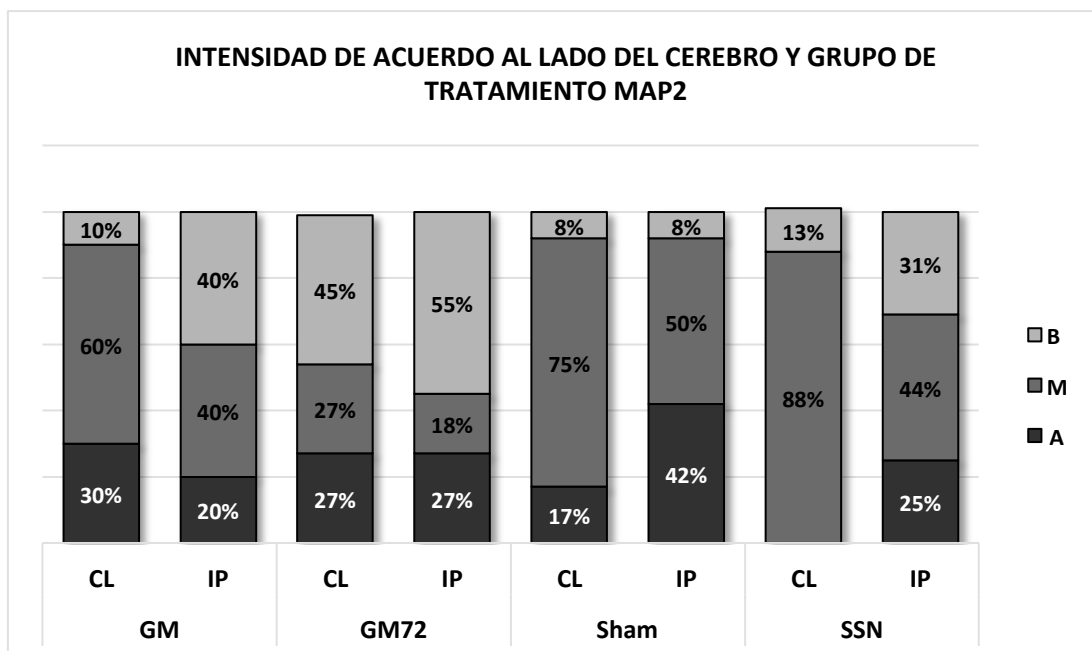


Figura 20. Porcentaje de las observaciones de los cortes cerebrales obtenidos de cada grupo experimental de acuerdo a la intensidad de MAP2 observada en los diferentes cortes cerebrales de los grupos y de acuerdo al hemisferio ipsilateral o contralateral. Grupo Sham con mayor porcentaje de intensidad intermedia en ambos hemisferios. GM: Metformina pre; GM72: Metformina post; SSN: Solución Salina; A: Intensidad Alta. M: Intensidad intermedia. B: Intensidad Baja. CL: Contralateral. IP: Ipsilateral

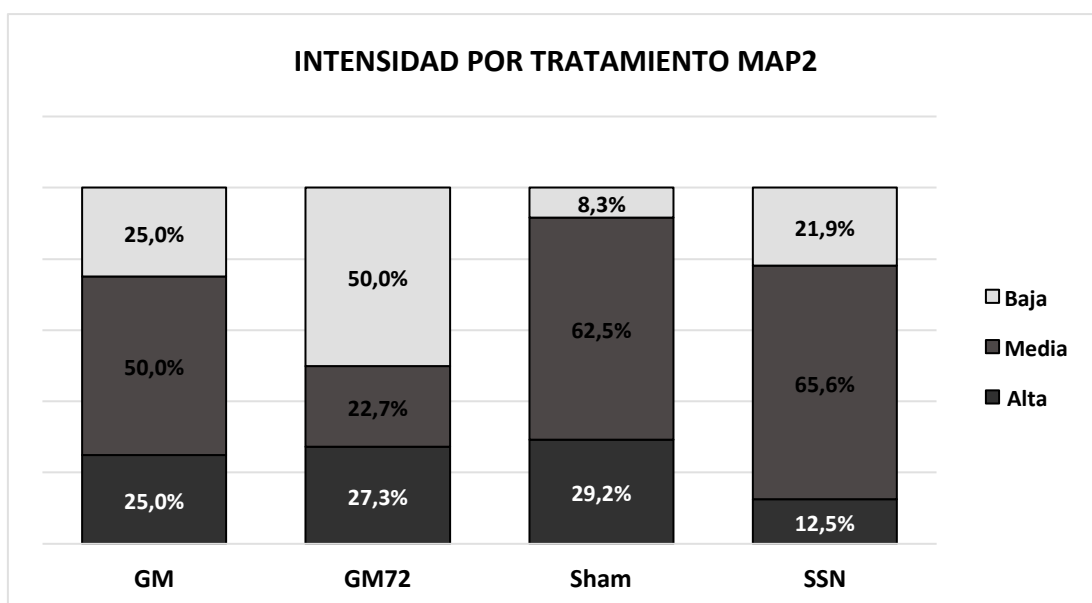


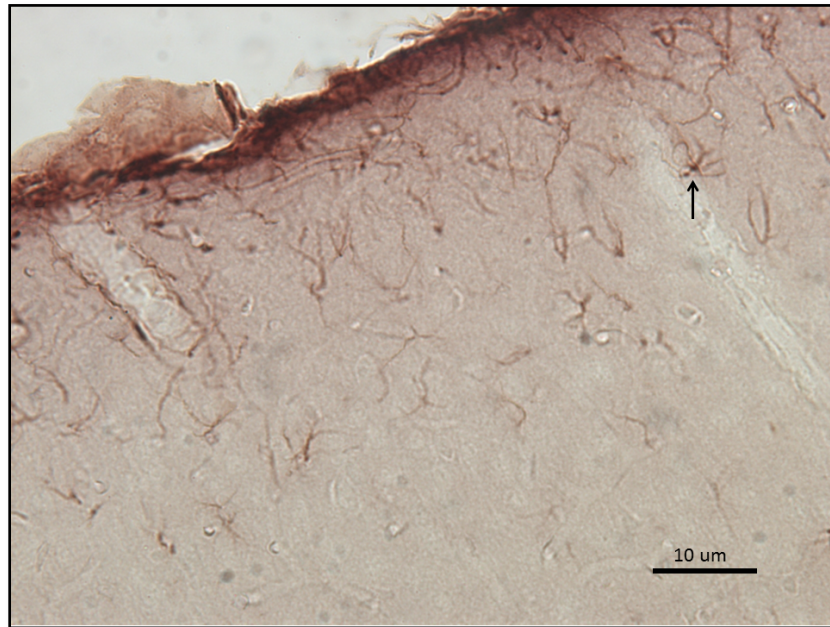
Figura 21. Porcentaje general de las observaciones cualitativas para los grupos experimentales de acuerdo a la intensidad para MAP2 en los cortes cerebrales. El grupo que mostró menor intensidad general fue el Grupo Metformina post 72 horas (50%). GM: Metformina pre; GM72: Metformina post; SSN: Solución Salina

Hubo diferencias al especificar la intensidad del hemisferio ipsilateral isquémico versus el contralateral, con reducción del porcentaje de observaciones con intensidad media en todos los grupos experimentales. El hemisferio ipsilateral del grupo metformina post (GM72) presentó mayor porcentaje de intensidad baja en ambos hemisferios.

La integridad de MAP2 se consideró intermedia y buena en las ratas Sham. Hubo alteraciones de la integridad de las dendritas apicales en los grupos experimentales, especialmente en el grupo Metformina posterior por 72 horas (GM72) con predominio de una nula integridad en el lado ipsilateral en el 82% de los cortes observados. El grupo con Metformina Pre no tuvo cambios en la integridad de los microfilamentos al comparar los hemisferios afectados (70% integridad intermedia en ambos lados). En el Grupo Solución Salina hubo diferencias en el lado contralateral (94% de integridad intermedia) versus el ipsilateral (69% de integridad intermedia). Estos datos no se muestran.

11.4. HIPERREACTIVIDAD GLIAL. USO DEL MARCADOR GFAP

Para el marcador de la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) se consideró la presencia o no de hipertrofia como cambios en la forma y grosor de la glía e intensidad del marcador. Se compararon los resultados con el grupo control no experimental. En ratas Sham no se observó hipertrofia (ver Figura 22).



*Figura 22. **Astrocytos ubicados en lámina I-III de la corteza cerebral motora de grupo Sham.** Se observan células gliales con morfología normal sin cambios sugestivos de reactividad glial. Esta imagen tiene buena intensidad, no hay hipertrofia y tiene un conteo alto de células gliales. La flecha señala un astrocito hacia el límite de la lámina I/II. Foto 40x*

Al observar el lado contralateral exofocal se encontró leve reactividad glial principalmente hacia la porción caudal, entre los límites de la lámina VI con el cuerpo calloso (ver figura 23). Sin embargo al analizar los diferentes cortes de los grupos experimentales que se marcaron con GFAP no hubo diferencias significativas en los grupos control y experimentales al analizar la presencia de hipertrofia de astrocytos en ambos hemisferios. La intensidad en el grupo metformina post 72 horas fue baja en ambos hemisferios.

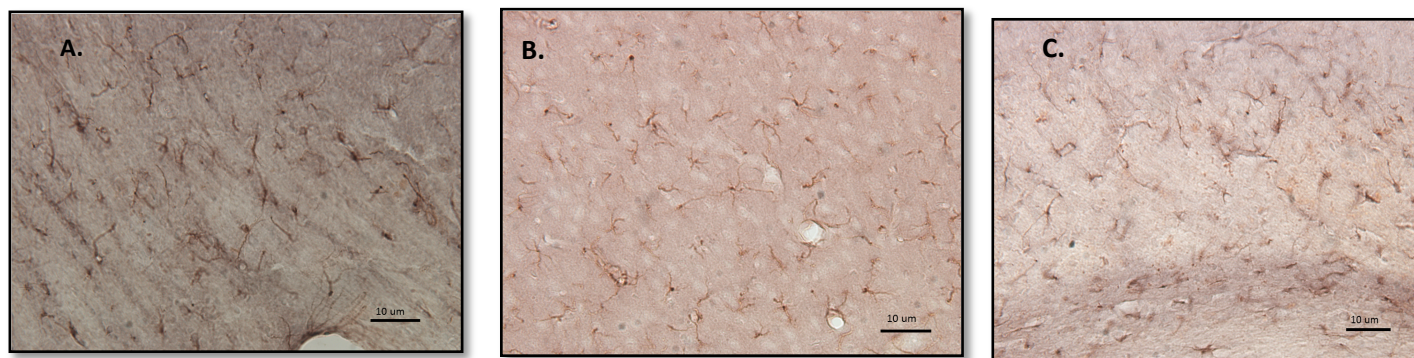


Figura 23. Determinación de la respuesta glial contralateral en láminas V y VI de la corteza cerebral con el uso del marcador GFAP. **A.** Fotografía de la transición de lámina VI sustancia blanca donde se observa reactividad glial con cambios en la morfología y número de astrocitos en el grupo Solución Salina. **B.** Fotografía con astrocitos hacia lámina VI en grupo Sham, sin hipertrofia. **C.** Fotografía grupo metformina pre con leve reactividad glial en lámina VI. Fotografías 40x.

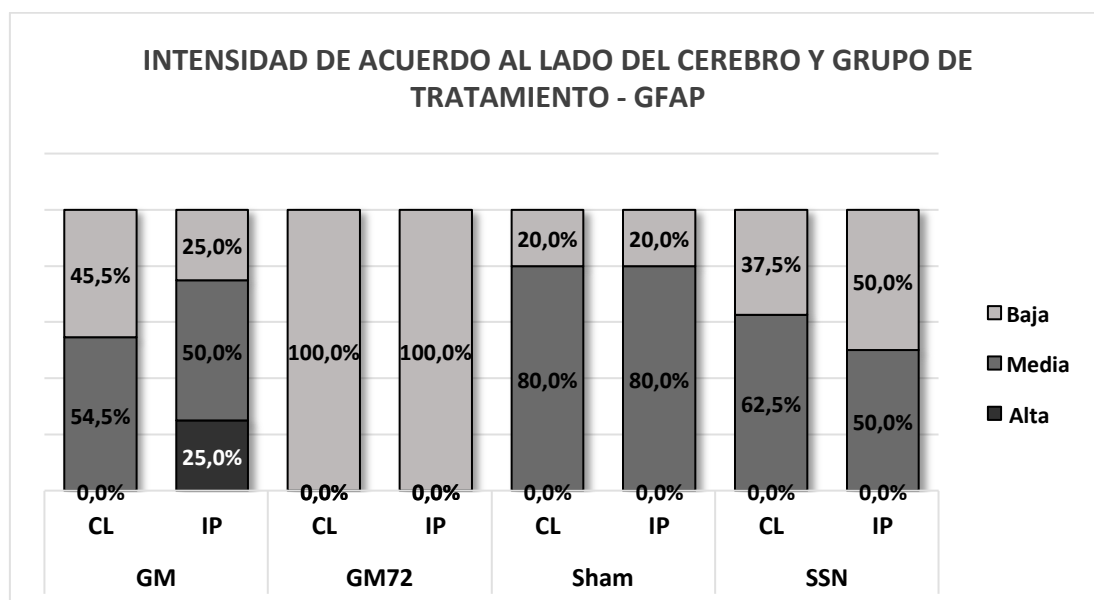


Figura 24. Diferencias porcentuales de la intensidad del marcador GFAP en los diferentes grupos experimentales del hemisferio del cerebro observado. El grupo Sham obtuvo un mayor porcentaje de intensidad intermedia para el marcador GFAP en ambos hemisferios. Hubo reducción en la intensidad de todos los grupos experimentales, principalmente en el grupo metformina Post (GM72) en ambos hemisferios. GM: Metformina pre; GM72:

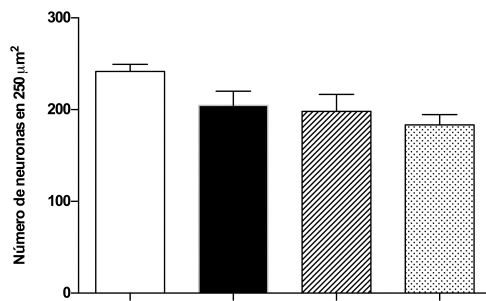
Metformina post; SSN: Solución Salina; A: Alta. M: Intermedia. B: Baja. CL: Contralateral. IP: Ipsilateral

11.5. NEUN

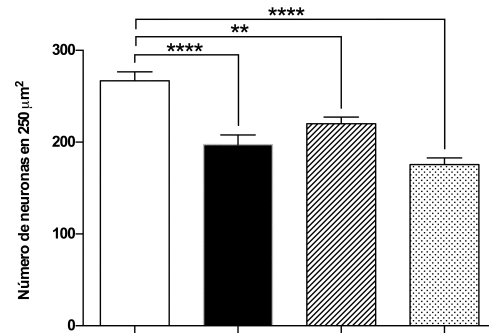
11.5.1. CORTEZA CEREBRAL, LÁMINA II/III

En la corteza cerebral motora, se contabilizaron los cuerpos neuronales identificados con NeuN específicamente en la lámina II-III en hemisferio Ipsilateral exofocal a la lesión y contralateral. Se observó una reducción significativa del conteo neuronal en todos los grupos experimentales en ambos hemisferios. El grupo experimental positivo obtuvo menores conteos tanto ipsilateral como contralateral al compararse con el grupo control negativo.

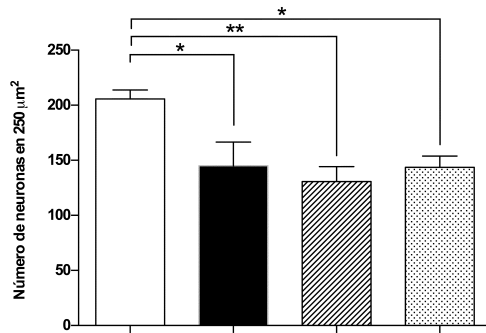
NeuN Lámina II/III Corteza Ipsilateral



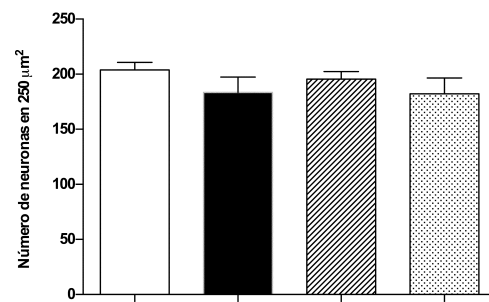
NeuN Lámina II/III Corteza Contralateral



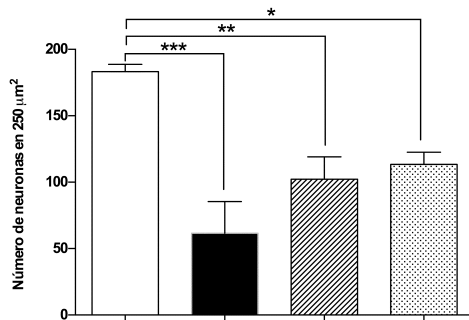
NeuN Lámina V/VI Corteza Ipsilateral



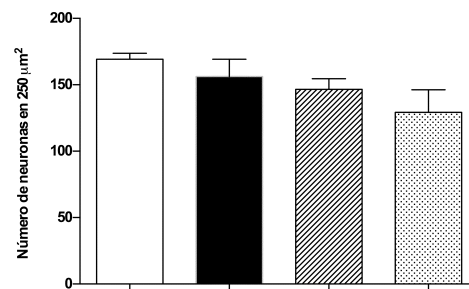
NeuN Lámina V/VI Corteza Contralateral



NeuN Estriado Ipsilateral



NeuN Estriado Contralateral



Control (Sham)
 Metformina pre-MCAO
 Metformina postMCAO
 Control Positivo (SSN + MCAO)

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$
 *** $p < 0.001$ *** $p < 0.001$

Figura 25. Histograma de los resultados del conteo neuronal del marcador NeuN por cada grupo con los valores promediados y con su SD estimada. Todos los grupos experimentales describen un menor conteo de neuronas comparado con el grupo Sham. El estriado ipsilateral tuvo los menores promedios de conteos en todos los grupos, principalmente en el grupo solución salina. Se encontraron diferencias significativas en el conteo en lado ipsilateral y contralateral exofocal en todos los grupos al compararse contra el grupo Sham * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

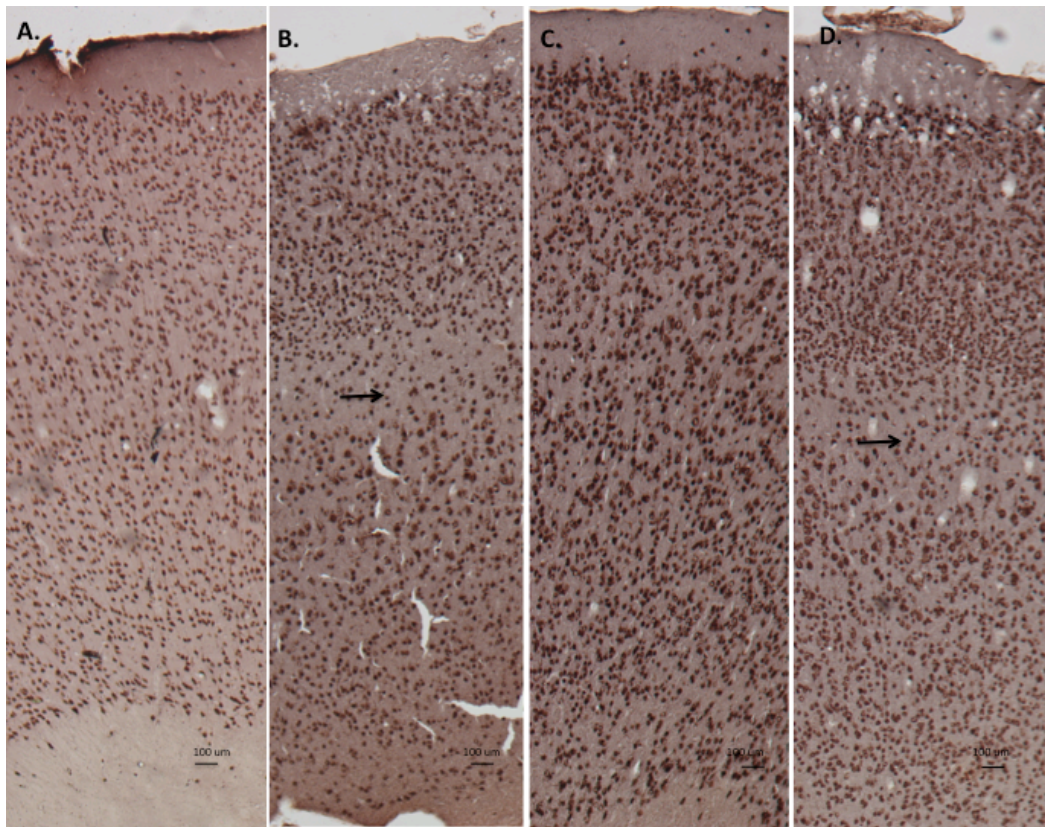


Figura 26. Cortes coroneales de la corteza cerebral contralateral con el marcador NeuN sobre la región motora dorsolateral. A. Sham, B. Grupo Solución Salina, C. Metformina Pre, D. Metformina Pos. Se aprecia reducción de la presencia de neuronas en la transición de láminas IV-VI en los grupos solución salina y metformina pos. Foto 10x.

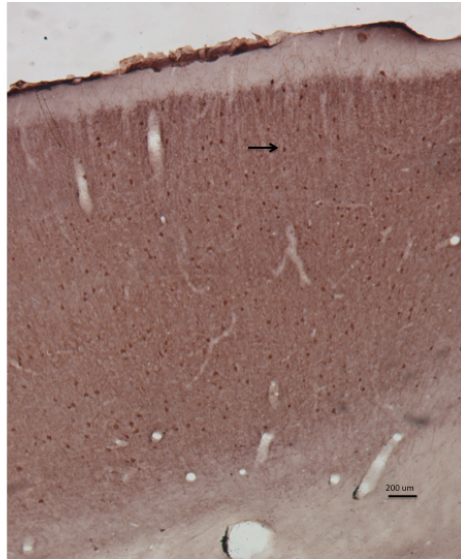
11.5.2. CORTEZA CEREBRAL, LÁMINA V-VI

En la lámina de la corteza cerebral motora V-VI también se observaron diferencias en el conteo de cuerpos neuronales con reducción significativa en todos los grupos experimentales tanto ipsilateral como contralateralmente. En el lado ipsilateral, hubo diferencias significativas entre el grupo SSN y Metformina al compararse contra el grupo que recibió Metformina posterior a 72 horas. No hubo diferencias significativas entre los grupos en el lado contralateral.

11.5.3. ESTRIADO

En los conteos neuronales en el estriado se encuentran diferencias significativas con menor población de neuronas contabilizadas en todos los grupos experimentales con reducción en conteo en el grupo solución salina en el lado ipsilateral de la isquemia cerebral. El lado contralateral no presentó diferencias tan notables, con reducción mayor en el grupo experimental positivo que utilizó metformina previamente.

11.6. PARVOALBÚMINA



*Figura 27. **Neuronas Parvoalbúmina positivas en la corteza motora de rata sham.** Fotografía de la corteza cerebral motora, la flecha señala soma de interneurona en lámina II. Se observan interneuronas en todas las láminas excepto lámina I. Foto 10x.*

Como otros autores han observado, no hubo cuerpos positivos para este marcador en Lámina I. La morfología de las interneuronas en las láminas II/III y V/VI mostraron soma y procesos dendríticos bien delimitados. En el estriado la marcación mostró unas interneuronas de mayor tamaño comparadas con la corteza motora. En regiones ipsilaterales a la isquemia, los grupos experimentales mostraron menor conteo y presencia de interneuronas positivas para Parvoalbúmina tanto en la corteza motora como en el estriado.

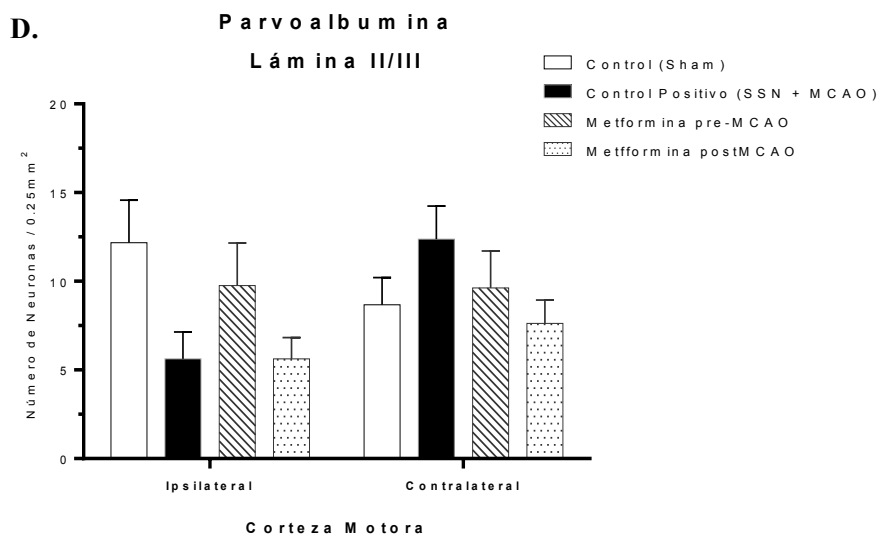
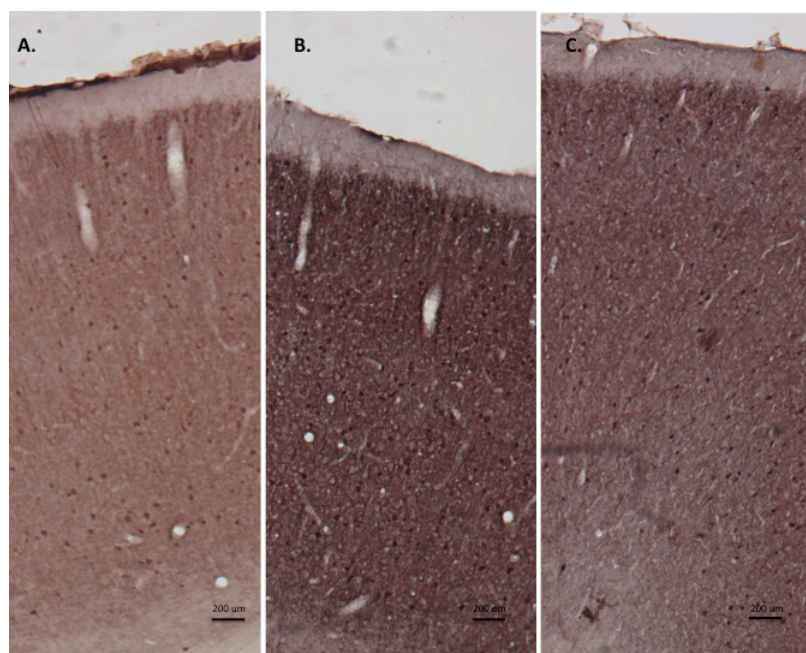


Figura 28. Interneuronas positivas para Parvoalbúmina en la corteza motora contralateral. A. Grupo Sham, B. grupo solución salina, C. Grupo metformina pre D. Histograma de los resultados del conteo en los grupos experimentales para esta interneuronas Parvoalbúmina +. Se observa mayor reactividad e interneuronas en el lado contralateral del grupo solución salina. En el grupo Metformina Pre se observa menor presencia de interneuronas parvoalbúminas + hacia lámina II/III del lado contralateral exofocal. Foto 10x

El conteo de interneuronas positivas para Parvoalbúmina en láminas II/III de la corteza motora, se observa reducción en todos los grupos de conteo en lado ipsilateral exofocal y aumento en la expresión en lado contralateral en el grupo solución salina. El grupo Metformina pre tiene no tiene cambios marcados en la expresión de Parvoalbúmina en lado contralateral.

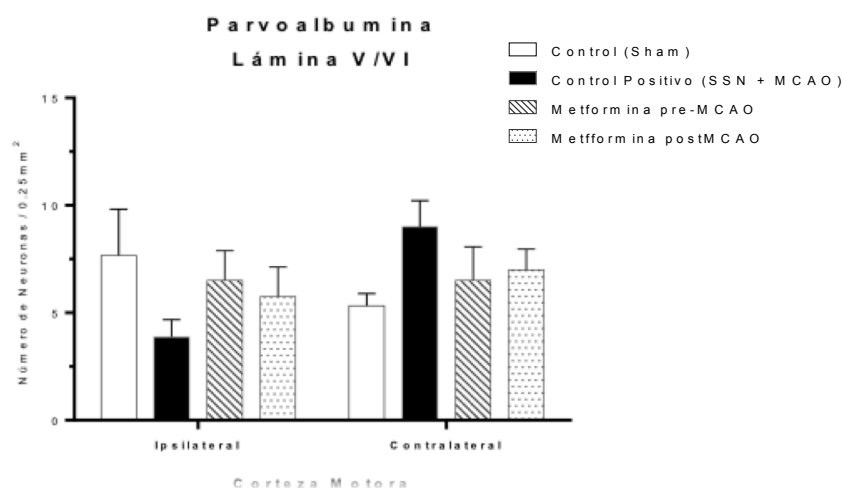


Figura 29. Histograma de conteo de interneuronas positivas para parvoalbúmina en la corteza motora en la lámina V-VI. Se observa en el lado ipsilateral exofocal menor conteo en todos los grupos especialmente en el grupo control solución salina comparado con el grupo Sham. En el lado Contralateral se observa mayor reactividad con un aumento en el conteo de las interneuronas positivas para parvoalbúmina, especialmente en el grupo solución salina. Grupo metformina pre no tuvo cambios significativos en el conteo de interneuronas ipsi y contralateral en esta lámina.

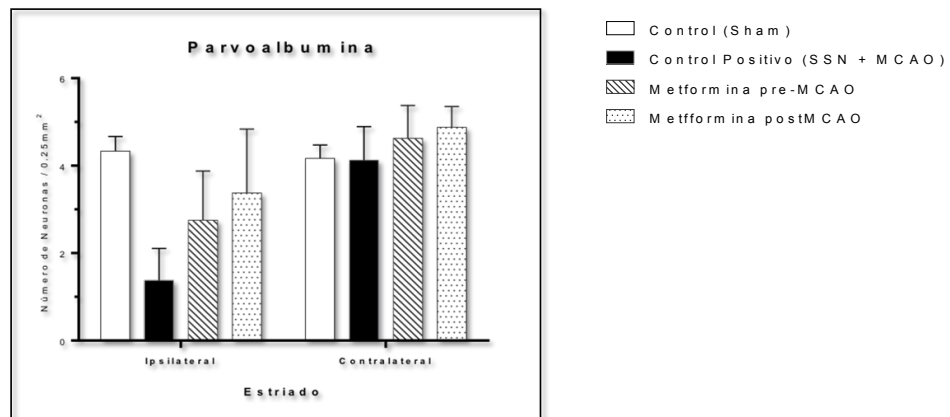


Figura 30. Histograma de los resultados promediados para el conteo de interneuronas positivas para Parvoalbúmina en las áreas exofocales ipsilaterales y contralaterales del estriado. Se observa una reducción importante en el conteo de interneuronas en el grupo experimental solución salina comparado con los otros grupos en el hemisferio ipsilateral exofocal. En el lado contralateral se aprecia aumento del conteo en todos los grupos, especialmente en grupo solución salina.

11.7. RESULTADOS PRUEBAS DE NEUROLÓGICAS

Como ya se indicó, se realizaron pruebas para valoración neurológica antes de isquemia, 24 y 72 horas posterior a isquemia. También se realizó la valoración del desempeño motor y balance en todos los grupos con tres días previos de entrenamiento y una nueva prueba 72 horas después de la isquemia. A continuación se detallan los resultados.

11.8. PRUEBAS NEUROLÓGICAS BEDERSON Y GARCÍA

Los promedios para cada rata, antes de la cirugía, a las 24 horas y a las 72 horas se exponen en el **Anexo 4**.

En la figura 31 están los resultados de la escala neurológica de Bederson por grupos de tratamiento. Menor puntaje indica menor déficit neurológico. Todos los grupos muestran una mejoría a las 72 horas después de la isquemia. El grupo con el peor pronóstico neurológico fue el grupo con tratamiento agudo de metformina, aunque los resultados no son estadísticamente significativos.

En la figura 32, se pueden observar los resultados promediados para la escala de García y Bederson. El grupo con el peor pronóstico neurológico, en promedio, fue el tratado de manera aguda con metformina, sin embargo los resultados continúan sin significancia estadística.

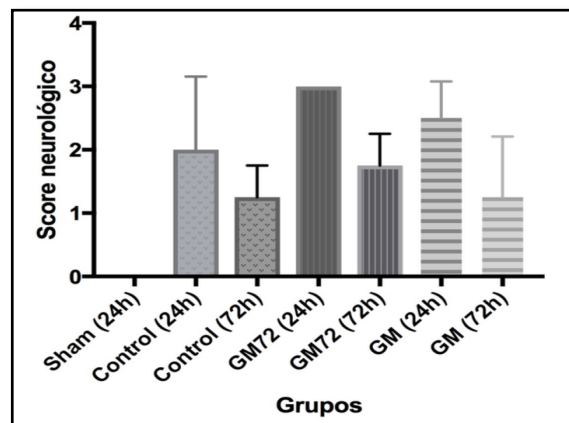


Figura 31. Resultados promedio Escala de Bederson a las 24 y 72 horas post-isquemia. Todos los grupos presentan deterioro neurológico a las 24 horas posisquemia y recuperación neurológica a las 72 horas. Control: Grupo Solución salina. GM72: Grupo metformina Post. GM: Grupo metformina Pre.

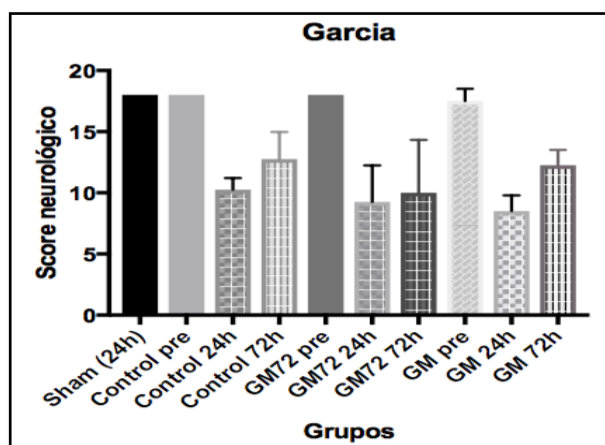


Figura 32. Resultados promedio de la Escala de García a las 24 y 72 horas post-isquemia. A mayor puntaje menos déficit neurológico (18: sin déficit; no se muestran resultados previos a la isquemia de grupos experimentales). Todos los grupos tienen puntajes altos al inicio con mayor deterioro a las 24 horas pos isquemia y parcial recuperación a las 72 horas. Control: Grupo Solución salina. GM72: Grupo metformina Post. GM: Grupo metformina Pre.

11.9. PRUEBAS MOTORAS

La prueba motora se realizó de acuerdo a la metodología ya descrita, con un entrenamiento previo y una nueva prueba 72 horas posterior a la isquemia cerebral. Los resultados para cada rata se encuentran en el **Anexo 5**.

La figura 33 muestra los resultados promediados por grupo en los tiempos (por segundo) para la realización de esta prueba. Se observa que las ratas tratadas con metformina, de manera crónica o aguda, demoran más tiempo en atravesar la barra después de la isquemia cerebral e incluso son incapaces de caminar por la barra, en comparación con aquellas que se trataron con solución salina. El tratamiento con metformina no muestra neuroprotección en cuanto a la función motora del hemisferio afectado. Estos resultados fueron estadísticamente significativos entre el grupo experimental con metformina previa y grupo sham con una $p < 0,05$.

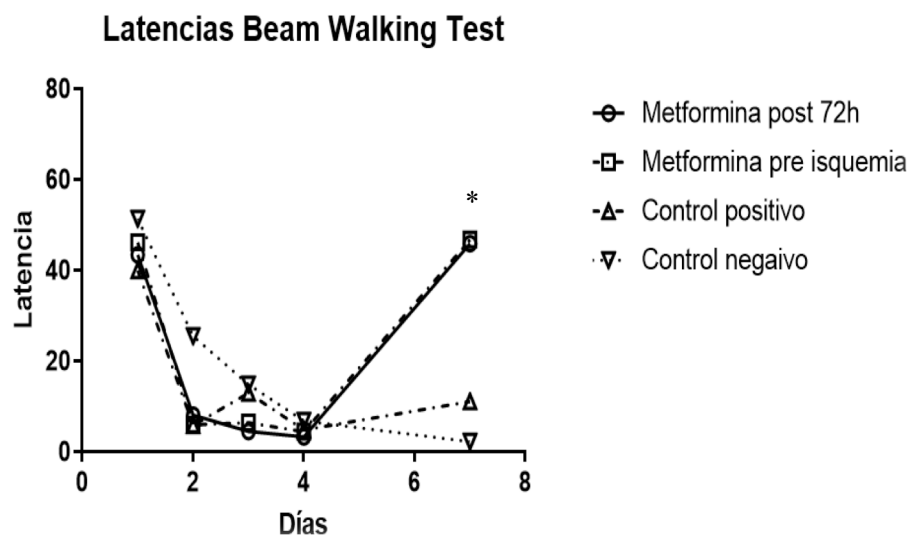


Figura 33. Resultados del promedio de tiempo para aprender a pasar por la barra de un metro de largo (Beam Balance) previo a la isquemia. En tres días de entrenamiento previo, todos los grupos mostraron reducción en el tiempo para pasar por la barra, con 40 segundos de tiempo aproximado el primer día de entrenamiento a aproximadamente tres segundos para pasar al tercer día de entrenamiento. En el día 4 se realiza video y nueva prueba a todos los grupos. 72 horas posterior a la isquemia cerebral, se realizó de nuevo la prueba. Se observa que los grupos tratados con Metformina caen de nuevo a los tiempos obtenidos el primer día de entrenamiento. * $p < 0,05$

12. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A pesar de los esfuerzos y las ideas de investigación básica, en la actualidad no se cuenta con un medicamento con la indicación como neuroprotector en isquemia cerebral. Las dificultades para entender y modificar la respuesta a la lesión en el sistema nervioso central de los mamíferos, y en especial en los humanos, parecen coincidir con el escaso éxito en la implementación de resultados promisorios en estudios preclínicos para algunas moléculas. Por este motivo, fármacos con efectos neuroprotectores en ratas como atorvastatina, minociclina, fluoxetina, TRH, glibenclamida e incluso AINEs, han fallado al extrapolarse al uso clínico para prevenir o favorecer la recuperación de pacientes que han padecido un accidente cerebrovascular.

En investigación básica en neurociencias el modelo de isquemia de la arteria cerebral media con el uso de un filamento intraluminal ha sido utilizado por investigadores que han modificado su metodología desde la propuesta inicial por Koizumi. Debido a la alta variabilidad para el tamaño del infarto del modelo con tiempos de isquemia menores de 60 minutos, se considera que 90 minutos es el tiempo que produce infartos cerebrales más consistentes, homogéneos en el volumen final (43). Se ha sugerido que la causa de esta variabilidad pueda estar relacionada con la cepa de rata estudiada y el modelo de isquemia escogida (focal, con o sin reperusión). La cepa Sprague-Dawley responde mejor a la reperusión que la cepa Wistar, aunque esta última tiene menor variabilidad en el tamaño del infarto (58). Otros factores que pueden generar mayor variabilidad en los resultados son la edad de las ratas y el peso ya que no hay una metodología establecida para realizar este procedimiento. Se ha utilizado este modelo de isquemia cerebral en ratas jóvenes sin tener en cuenta que los eventos isquémicos en humanos suceden principalmente en pacientes adultos mayores (59). Nuestra investigación prefirió el uso de ratas jóvenes entre 250 a 350 g (12 a 14 semanas) por los antecedentes previos de éxito como neuroprotector de la metormina reportado por otros investigadores y por el deseo de investigar sus acciones neuronales exclusivas sin la presencia de otras comorbilidades vasculares. Las ratas más jóvenes permiten descartar otros efectos pleiotrópicos descritos para metformina, especialmente por las acciones farmacológicas en la vasculatura arterial y la barrera hematoencefálica (12,60,61). Para disminuir la variabilidad en el tamaño del infarto nuestro grupo decidió usar el monofilamento cubierto en un extremo con silicona, mantener la eutermia durante todo el

procedimiento, controlar las condiciones de esterilidad quirúrgica y estandarizar la intervención a un tiempo promedio de 45 minutos (53). Con estas condiciones se logró una mortalidad final del 40% similar a lo reportado por otros grupos que tienen una mortalidad máxima de 60% (58).

Los resultados de esta investigación evidencian cambios celulares en zonas distantes al foco isquémico y efectos neuroprotectores de la metformina con reducción del tamaño del infarto y una mayor sobrevivencia de las neuronas ubicadas en el estriado y la corteza cerebral, resultados similares a lo reportado por otros autores ya referenciados. La prueba que utilizamos para determinar el tamaño del infarto con el marcador de viabilidad mitocondrial (TTC) se realizó a las 24 horas posisquemia, tiempo en que se observan los máximos cambios con el uso de este marcador y que mostró una menor área y volumen estimado del infarto cerebral en el grupo que recibió metformina durante dos semanas antes del infarto. Nuestros resultados son similares a los reportados por otros autores que también han encontrado una reducción del tamaño del infarto con el uso de Metformina desde 2 a 3 semanas antes de la isquemia y que se ha sugerido puede ser a expensas de mantener la viabilidad de las neuronas que están en el área de penumbra. Sin embargo esta valoración de los efectos neuroprotectores es insuficiente debido a que se ha reportado respuestas clínicas y de rehabilitación que no tienen mayor relación con el tamaño del infarto.

El enfoque del Centro de Estudios Cerebrales valora más los cambios observados en la conectividad asociados a la lesión. Por esta razón, el método de evaluación propuesto para las acciones de la metformina se examinaron en regiones exofocales que tienen conexiones con el foco isquémico y el área de penumbra. Se evaluaron regiones exofocales próximas como la corteza y la región ventromedial del estriado ipsilateral y regiones distantes como la corteza motora primaria y el estriado contralateral. Con esta estrategia se aíslan los efectos vasculares directos de la isquemia y se valora con mayor atención la respuesta a la lesión del tejido aparentemente no isquémico. Nuestra hipótesis de evaluación neuroprotectora considera que las regiones conectadas con el área isquémica deben expresar cambios celulares consistentes con los resultados clínicos observados.

Durante la evaluación neurológica, todos los grupos mostraron déficit neurológico a las 24 horas, con una alta tasa de recuperación de las ratas a las 72 horas posisquemia.

La metformina no previno ni modificó los efectos durante el desempeño motor del grupo metformina (tanto pre y pos). Estos resultados indican que metformina no favorece una rápida recuperación en la actividad motora durante las primeras 72 horas de la posisquemia. Sin embargo, en el seguimiento hasta por tres semanas después de la isquemia cerebral, se ha descrito resultados neuroprotectores de metformina en las pruebas de memoria y aprendizaje (41). Se podría suponer que metformina puede tener efectos neuroprotectores a largo plazo y a diferentes niveles del sistema nervioso, con mayor neuroprotección en el estriado y zonas hipocampales que en las conexiones corticocorticales de la corteza motora. En el modelo de isquemia cerebral en ratas no es frecuente el reporte de resultados con seguimiento hasta por seis meses posterior a la isquemia, probablemente por la alta mortalidad observada y la dificultad para lograr un número significativo de sujetos. Además, en el largo plazo, la mejoría neurológica intrínseca de las ratas se convierte en un desafío metodológico para las pruebas que intenten evaluar estos cambios (64). Consideramos que si extrapolamos estas pruebas a los humanos, sería interesante observar los resultados prospectivos de los pacientes en tratamiento con metformina con accidente cerebrovascular reciente y que están inscritos en un programa de rehabilitación neurológica por al menos seis meses y comparar con controles que no reciban este antidiabético oral.

Hasta la fecha, ningún investigador ha realizado esta aproximación de sus resultados histológicos con el pronóstico clínico de pruebas de desempeño motor en ratas o ratones sometidos a isquemia cerebral y tratados con metformina. Debe considerarse que los efectos de metformina observados en nuestro estudio se deben principalmente a la valoración de las neuronas afectadas en las regiones foco de la isquemia cerebral, sin diferenciar el desempeño de cada hemisferio individualmente. Se ha descrito resultados similares paradójicos de neuroprotección a nivel histológico, pero sin mejoría en la valoración de las pruebas de motricidad. Estos hechos son quizás porque el foco sigue estando en la corteza motora primaria y el estriado dorsolateral, lo cual se reflejaría en el desempeño de esta prueba clínica (63).

Para realizar el análisis celular, decidimos esperar hasta transcurridas 72 horas desde la inducción de la isquemia antes de obtener el tejido cerebral y realizar el análisis inmunohistoquímico para permitir que ocurriesen los cambios celulares que buscamos. Entre los cambios celulares que consideramos relevantes de mencionar son los conteos de neuronas en el estriado y la corteza cerebral ipsilateral y contralateral exofocal. La presencia de neuronas en las láminas II/III, V/VI y el estriado fueron menores en todos los grupos en ambos hemisferios al compararse con el grupo Sham. Nos interesaba evidenciar principalmente los cambios de las regiones exofocales ipsilateral y contralateral, especialmente la lámina II/III de la corteza cerebral motora ya que las conexiones corticocorticales se realizan entre las eferencias desde las neuronas piramidales de la lámina III y las aferencias que llegan a lámina II/III contralaterales. No se encontró una reducción significativa de neuronas en lámina II/III ipsilateral, creemos por estar en una región exofocal con una irrigación parcial por la arteria cerebral media y en mayor porcentaje por ramas de la arteria cerebral anterior. Además, la corteza cerebral exofocal ipsilateral que evaluamos tiene menos conexiones con la corteza motora del foco que la corteza contralateral. Si en cambio se observó una reducción significativa de las neuronas de las láminas II/III en el lado contralateral probablemente secundario a las conexiones con neuronas ubicadas en el foco isquémico y a los cambios secundarios esperados posteriores a la axotomía con muerte de la neurona posináptica. En esta lámina el grupo que recibió Metformina Pre obtuvo un mayor conteo de neuronas lo que sugiere neuroprotección. El grupo que recibió metformina después de la isquemia obtuvo el menor conteo, observación similar a lo reportado por otros autores, que describen un efecto deletéreo de la metformina con su uso en el cuadro agudo del ictus (24). Creemos que el menor número de neuronas en todos los grupos experimentales para las que estaban ubicadas en la lámina V/VI de la región exofocal ipsilateral, se debe al fenómeno similar ya descrito para la lámina II/III, ya que entre las zonas subcorticales donde se proyectan las neuronas piramidales de la lámina V, está el estriado ipsilateral y contralateral (Figura 4). Resulta interesante observar los cambios celulares en el estriado por ser una zona cerebral muy sensible a la isquemia de la arteria cerebral media ya que sus ramas finales no tienen colaterales como se describen en la corteza cerebral (65). El estriado ventromedial ipsilateral tiene los menores conteos de neuronas al compararse con el grupo Sham y aunque parece ser una zona exofocal en términos de

conectividad al no recibir conexiones de la corteza foco, si parece estar comprometido vascularmente por ramas colaterales derivadas de la arteria cerebral media. En el estriado ipsilateral exofocal se observaron las mayores diferencias entre los grupos experimentales al registrar un menor conteo de neuronas en todos los grupos comparados contra Sham. El grupo que recibió Metformina Pre por dos semanas antes de la isquemia obtuvo el mayor conteo de neuronas, sugestivo de un efecto neuroprotector de la Metformina con su uso crónico. Estos resultados coinciden con los reportes de algunos autores citados en la **Tabla 2**. Probablemente la activación previa de AMPK predispone a las neuronas a la isquemia, con un fenómeno similar que se ha descrito con la exposición previa de infartos pequeños y la presencia de IL-1 β (66). Sin embargo, no puede relacionarse directamente un mayor conteo de neuronas con un mejor pronóstico neurológico según nuestro enfoque de evaluación exofocal. Tampoco se ha establecido cual es el porcentaje o cociente de neuronas viables excitatorias e inhibitorias durante la fase aguda de la posisquemia con el uso de metformina.

Los efectos de la metformina en una subpoblación de neuronas inhibitorias ubicadas en regiones exofocales indicaron que el número de interneuronas positivas para parvoalbúmina mostró diferencias entre los grupos sugestivos de un patrón de neuroprotección con el uso de metformina. Nuestro grupo de investigación ya había realizado en el pasado la observación de interneuronas positivas para parvoalbúmina y calbindina en regiones exofocales o alejadas del núcleo de la lesión (2,3). Previamente nuestro grupo de investigación había descrito que los cambios en la corteza contralateral de estas interneuronas mostraron discrepancias y se consideraron que podían ser secundarias a la conectividad interlaminar como a los cambios en las aferencias excitatorias provenientes desde las neuronas piramidales del foco de la lesión.

Con el uso de metformina encontramos que la reducción en el conteo de interneuronas positivas para parvoalbúmina fue notorio en el estriado ipsilateral de todos los grupos, más pronunciado en el grupo que recibió solución salina, sin cambios significativos en los grupos experimentales con metformina previa y post isquemia. Creemos que estos resultados son debidos a la isquemia y la muerte neuronal secundaria de esta región cerebral. Al observar la corteza cerebral contralateral se describe una mayor inmunoreactividad en las ratas del grupo solución salina lo cual ya había sido descrito por nuestro grupo de investigación y también en otros experimentos que han utilizado el mismo modelo de isquemia en roedores, pero que

han utilizado otras moléculas diferentes a metformina (3,63). Consideramos que la menor expresión de estas interneuronas por la metformina en el lado contralateral puede representar los efectos favorables de los fármacos con acciones neuroprotectoras al aumentar la sobrevivencia de estas interneuronas y contener la excitotoxicidad de neuronas cercanas al foco de la lesión. Kwan y colaboradores describieron acciones neuroprotectoras de la fluoxetina con la reducción en la expresión de parvalbúmina en el lado ipsilateral posterior a la isquemia en una región premotora frontal del ratón (63). Nosotros encontramos una reducción significativa de interneuronas en el estriado ipsilateral y las láminas de la corteza cerebral ipsilaterales exofocales del grupo solución salina comparado con las ratas que recibieron metformina dos semanas antes de la isquemia. Al parecer por un mecanismo compensatorio, en el lado contralateral se observó un aumento en la expresión de parvalbúmina en el grupo control que recibió solución salina. Estas diferencias fueron notorias en el estriado y en la lámina II/III de la corteza contralateral al foco de la lesión para el grupo solución salina y podrían indicar que la metformina tiene efectos neuroprotectores sobre estas interneuronas que expliquen los cambios descritos. Un posible mecanismo sería que al reducir el porcentaje de interneuronas muertas en el lado ipsilateral exofocal se contribuye a una menor excitación del lado contralateral y una consecuente menor expresión de interneuronas positivas para parvalbúmina. El uso de Ketamina (un antagonista indirecto del receptor de glutamato NMDA) reduce la expresión de interneuronas parvalbúmina positivas (67). Esto se explicaría por las características fenotípicas de estas interneuronas de disparo rápido, su morfología en células de axon corto como las células en cesta y en candelabro y a su particularidad de presentar uniones gap que le permiten una rápida inhibición de las neuronas piramidales de la lámina V que se proyectan a regiones subcorticales como el estriado (44). Una reducción en la expresión de estas interneuronas podría favorecer el disparo rápido de las neuronas piramidales, que en el contexto de una isquemia cerebral, podría ser una causa adicional que favorece la excitotoxicidad por glutamato descrita en este proceso fisiopatológico. Se desconoce si la inhibición de las neuronas piramidales cercanas al foco o conectadas puede ser un factor determinante en el pronóstico y rehabilitación de los pacientes. Sin embargo, los cambios descritos sugieren que parvalbúmina es un marcador sensible para evaluar zonas exofocales. La disminución de la expresión de parvalbumina generada por el uso de la metformina no ha sido descrita por otros autores.

Al observar las dendritas apicales de neuronas ubicadas en la corteza motora se evidenció un mayor deterioro del árbol dendrítico en el grupo que recibió metformina posterior a la isquemia, hallazgos similares a lo reportado por otros autores que concluyen un efecto deletéreo de la metformina cuando se inicia justo después de la isquemia. En general, parece que no hubo un efecto neuroprotector con el uso de metformina sobre la población de neuronas piramidales o no se pudo visualizar estos cambios con este marcador. Esto sugiere que MAP2 no es buen indicador de lesión exofocal o las neuronas piramidales son más sensibles a las aferencias excitatorias desde el foco que las interneuronas gabaérgicas. Aunque se encontró una reducción en la intensidad de la expresión de GFAP en ambos hemisferios posterior a la isquemia en el grupo metformina pos, todos los grupos mostraron cambios cualitativos sugestivos de reactividad glial principalmente en la lámina I y VI en ambos hemisferios, descritos también previamente por otros autores en el modelo de isquemia cerebral (46).

La recuperación neurológica de las ratas en el corto plazo es un hecho que demuestra las grandes diferencias entre el sistema nervioso de los primates comparado con los roedores. Aunque la plasticidad puede ser uno de los fenómenos que expliquen esta rápida recuperación de los roedores, en este estudio se observó que metformina favorece la sobrevida de las neuronas conectadas con el foco en lugares distantes de este y en el estriado pero sin mejoría en el corto plazo en la motricidad. Aunque es debatible, creemos que los efectos neuroprotectores de metformina pueden estar relacionados con un menor tamaño y área del infarto, probablemente a sus acciones vasoprotectoras descritas más que a sus acciones sobre una proteína o objetivo específico en los cuerpos neuronales como puede ser la AMPK o la sintasa de óxido nítrico neuronal. Sin embargo, los cambios observados en la expresión de interneuronas parvoalbúminas positivas no pueden explicarse solamente por este mecanismo e implican acciones sobre el sistema gabaérgico y/o glutamatérgico. Algunos estudios han mostrado efectos de la metformina en la activación y expresión del receptor metabotrófico GABA_B con hiperpolarización secundaria de la neurona post-sináptica, mecanismo que podría relacionarse con sus efectos neuroprotectores en el tejido donde están ubicadas estas neuronas (excitatorias e inhibitorias), pero especialmente para las neuronas piramidales que pueden ser más sensibles a la isquemia y que son las células donde se ha descrito la presencia de los receptores GABA_B (35,68).

Las lesiones exofocales distantes al foco de la lesión isquémica han sido estudiadas en el pasado por muchos investigadores quienes han descrito cambios celulares asociados lejos del foco isquémico. La gran conectividad del sistema nervioso permite suponer que las lesiones isquémicas en alguna zona delimitada como la corteza motora y/o somatosensorial tendrán repercusión en sus bordes, zona de penumbra y en las zonas cerebrales alejadas que no han sufrido deterioro en su perfusión sanguínea tanto ipsilaterales como contralaterales (1). Los resultados para el grupo experimental que recibió metformina después de la isquemia son similares a los reportados por otros investigadores que han encontrado que en el corto plazo, la metformina no ofrece neuroprotección. Parece razonable suponer que la sobreactivación de AMPK momentos u horas posterior a la isquemia con el suministro oral de metformina puede traer un desbalance adicional en el parénquima que ha sufrido hipoxia o una caída de la perfusión por varios minutos. Puede que algunos de estos efectos nocivos sean por mecanismos indirectos como la acumulación de lactato con acidosis secundaria y deterioro del microambiente neuronal. Finalmente, en relación con la gran conectividad del sistema nervioso, no existen estudios que evalúen el papel de la metformina en la matriz extracelular y sus acciones indirectas en la neuroprotección de los axones distales durante la axotomía secundaria a la muerte neuronal en el foco isquémico.

13. CONCLUSIONES

Los resultados por nuestro grupo encontrados nos permiten hacer las siguientes conclusiones:

El uso profiláctico de metformina es neuroprotector al ser valorado en regiones exofocales.

La expresión de parvoalbúmina es un buen indicador de un efecto exofocal de la lesión y un buen indicador del efecto neuroprotector contra la hiperexcitabilidad del tejido exofocal tras el tratamiento con metformina.

14. ANEXOS

14.1. ANEXO 1. ESCALAS DE VALORACIÓN NEUROLÓGICA DE BEDERSON Y GARCÍA.

ESCALA DE BEDERSON

Flexión

Algún grado de flexión de la extremidad anterior (Puntaje = 1)

Ambas extremidades anteriores extendidas hacia el piso (Puntaje=0)

Empuje lateral

Reducción consistente en la resistencia al empuje lateral hacia el lado parético (Puntaje=1)

No reducción en la resistencia al empuje lateral hacia el lado parético (Puntaje=0)

Dando vueltas

Da vueltas consistentemente (Puntaje=1)

No da vueltas (Puntaje =0)

ESCALA DE GARCÍA

Actividad espontánea

Se mueve alrededor, explorando la caja (Puntaje=3)

Se mueve alrededor "a regaña dientes", alcanza al menos un lado de la jaula (Puntaje=2)

Apenas se mueve en la jaula, no alcanza ningún lado de la caja (Puntaje=1)

No se mueve en lo absoluto (Puntaje=0)

Simetría en el movimiento para las cuatro extremidades.

Las cuatro extremidades se extienden simétricamente (Puntaje=3)

Las extremidades el lado contralateral se extienden menos que las extremidades del lado ipsilateral de isquemia (Puntaje=2)

Las extremidades del lado contralateral exhiben un mínimo movimiento (Puntaje=1)

Las extremidades del lado contralateral no tienen movimiento (Puntaje=0)

Extensión patas anteriores

Extiende las patas anteriores, camina simétricamente sobre las patas delanteras (Puntuación=3)

Lado izquierdo menos extendido que el "derecho", pata afectada al caminar (Puntuación =2)

La pata anterior izquierda tiene movimiento limitado (Puntuación=1)

La pata anterior izquierda no se mueve en lo absoluto (Puntuación=0)

Trepar

Trepa, agarra fuertemente con ambas patas delanteras (Puntuación=3)

Lado izquierdo deteriorado, no agarra tan fuerte y libera antes de la derecha (Puntuación=2)

No trepa (Puntuación=1)

Propiocepción del cuerpo

Reacciona girando la cabeza, comenzando igualmente, por estímulos, en ambos lados (Puntuación=3)

Reacciona lentamente a estímulos en el lado izquierdo (Puntuación=2)

No reacciona ante estímulos en el lado izquierdo (Puntuación=1)

Vibrisas

Reacciona girando la cabeza, comenzando igualmente, por estímulos, en ambos lados (Puntuación=3)

Reacciona lentamente a estímulos en el lado izquierdo (Puntuación=2)
No reacciona ante estímulos en el lado izquierdo (Puntuación=1)

14.2. ANEXO 2. ESCALA DE VALORACIÓN CUALITATIVA DEL “BEAM WALKING TEST”

PUNTAJE	DESCRIPCIÓN
0	Balance adecuado, con postura y equilibrio
1	Se agarra a la viga de madera
2	Abraza la viga de madera y un miembro queda en el aire (sin agarre)
3	Abraza a la viga de madera y dos miembros cuelgan (sin agarre)
4	Intenta balancearse en la viga de madera hasta por 40 segundos pero cae
5	Intenta balancearse en la viga de madera hasta por 20 segundos pero cae
6	Siempre cae antes de 20 segundos

14.3. ANEXO 3. RESULTADOS DE CORTES CORONALES EN LA CORTEZA
MOTORA DE ACUERDO A LA CLASIFICACIÓN DEL ATLAS DE PAXINOS.

Cerebro	MAP2		Neun		GFAP		Parvoalbúmina	
	Interaural	Bregma	Interaural	Bregma	Interaural	Bregma	Interaural	Bregma
W2 C.1	9.96	0.96	9.12	0.12	10.56	1.56	8.76	-0.24
W2 C.4	8.76		9.48	0.48	9.12	0.12	8.76	-0.24
X2 SSN C.3	9.24	0.24	10.92	1.92	9.84	0.84	9.84	0.84
X2 SSN C.4	9.96	0.96			NSD	NSD	9.60	0.60
R2GM72 C.3	9.12	0.12	9.84	0.84	9.96	0.96	9.48	0.48
R2GM72 C.4	10.44	1.44			10.20	1.20	10.08	1.08
R11 MET C.1	10.28	1.28	9.60	0.60				
R11 MET C.2	10.28	1.28	8.64	-0.36	8.64	-0.36	9.84	0.84
R11 MET C.3			9.00	0.00	9.24	0.24	8.64	-0.36
5Q C.3	10.08	1.08	9.00	0.00	9.00	0.00	8.76	-0.24
5Q C.4	10.28	1.28	10.20	1.20	8.64	-0.36	9.00	0.00
X1 SSN C.3	10.80	1.80	9.72	0.72	9.24	0.24	10.68	1.68
X1 SSN C.4	10.56	1.56	10.68	1.68	9.96	0.96	10.92	1.92
R6F1 C.3	9.00	0.00	10.68	1.68	8.52	-0.48	8.64	-0.36
R6F1 C.2			8.64	-0.36	8.64	-0.36	8.76	-0.24
R6F1 C.4	8.64	-0.36	8.64	-0.36				
Y3 MET C.3	10.56	1.56	11.04	2.04	9.48	0.48	8.04	-0.96
Y3 MET C.4	10.44	1.44	9.84	0.84			10.80	1.80
Y3 MET C.1			10.92	1.92				
1Q SSN C.3	10.44	1.44	10.44	1.44	9.72	0.72	10.28	1.28
1Q SSN C.4	10.44	1.44	10.68	1.68	10.44	1.44	10.56	1.56
R4GM72 C.3	10.80	1.80	10.56	1.56	9.84	0.84	9.24	0.24
R4GM72C.4	9.72	0.72	9.24	0.24	NSD	NSD	9.84	0.84
R9 MET C.3	10.28	1.28	9.72	0.72			10.80	1.80
R9 MET C.4	10.44	1.44	8.64	-0.36			10.20	1.20
R5 GF1 C.4	9.96	0.96	10.08	1.08	8.64	-0.36	10.20	1.20
R5 GF1 C.5	9.00	0.00	9.96	0.96	9.48	0.48	9.84	0.84

*NSD = No se puede determinar

14.4. ANEXO 4. RESULTADOS DE ESCALAS NEUROLÓGICAS BEDERSON Y GARCIA. GM72: GRUPO METFORMINA POST; GM: GRUPO METFORMINA; SSN: GRUPO SOLUCIÓN SALINA

Identificación		Escala de Bederson			Escala de García		
GRUPO	BIOMODELO	Pre isquemia	24h	72h	Pre isquemia	24h	72h
GM72	P1	0	3	2	18	6	6
GM72	P2	0	3	2	18	13	16
GM72	P4	0	3	1	18	8	8
GM72	P5	0	3	2	18	10	10
GM	M1	0	3	1	18	8	12
GM	M2	0	3	2	16	10	11
GM	M3	0	2	2	18	7	12
GM	M4	0	2	0	18	9	14
SSN	S3	0	3	1	18	11	12
SSN	S4	0	3	2	18	10	12
SSN	S5	0	1	1	18	9	11
SSN	S6	0	1	1	18	11	16
SHAM	SHAM 1	0	0	0	18	18	18
SHAM	SHAM 2	0	0	0	18	18	18

14.5. ANEXO 5. TABLA CON LOS RESULTADOS DE LOS GRUPOS EN LA PRUEBA MOTORA DE BALANCE (BEAM WALKING TEST).

Identificación			Preisquemia			Post isquemia		
Grupo	Sujeto	Nombre	Tiempo (s)	Deslizamientos	Puntaje	Tiempo (s)	Deslizamientos	Puntaje
GM72	P1	R2	3,3	0	0	No pasó	No pasó	4
GM72	P2	R3	3,8	0	0	3,6	0,5	1
GM72	P4	R5-F1	2,4	0	0	No pasó	No pasó	4
GM72	P5	R6-F1	3,7	1	1	No pasó	No pasó	6
GM	M1	R9	2,8	0,5	0	No pasó	No pasó	3
GM	M2	R11	2,8	0,5	0	No pasó	No pasó	6
GM	M3	W2	9	1	1	No pasó	No pasó	6
GM	M4	Y3	3	1	0	7	2,8	2
SSN	S3	Q1	4,7	0	0	9,8	5	3
SSN	S4	Q5	3,3	0,5	1	4,8	4	2
SSN	S5	X1	5,3	0	1	23,9	4	2
SSN	S6	X2	6,1	0,5	1	6	1,5	2
SHAM	SHAM 1	R1	6,3	0	0	2,1	0	0
SHAM	SHAM 2	R4	7,3	0	0	2,4	0	0

14.6. ANEXO 6. RESULTADOS DE LAS VARIABLES DE SEGUIMIENTO A LOS BIOMODELOS DURANTE LA CIRUGÍA

IDENTIFICACIÓN		PESO (g)			GLUCOMETRÍA (mg/dL)		TEMP. (°C)
Nombre	Grupo	Inicio gavaje	Día cirugía	72 h post-isquemia	Pre-cirugía	Durante la cirugía	Promedio
S1	SSN	247	287	228	95	287	36,83
S2	SSN	232	269	210	81	89	36,48
S3	SSN	240	289	224	119	172	37,00
S4	SSN	238	296	260	93	163	37,00
M1	METF - PRE	227	284	220	114	153	38,06
M2	METF - PRE	235	294	223	103	153	37,06
M3	METF - PRE	230	284	219	99	130	37,43
M4	METF - PRE	248	285	225	106	154	36,8
P1	METF - POS	247	262	215	153	227	36,95
P2	METF - POS	248	214	214	132	169	36,45
P3	METF - POS	243	300	244	99	244	38,3
P4	METF - POS	233	265	230	110	177	37,86

SSN = Control positivo

METF – PRE = Metformina pre-isquemia

METF – POS = Metformina post-isquemia

14.7. ANEXO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

14.7.1. ANOVA PARVOALBÚMINA; ESTADISTICA ESTRIADO

Compare cell means regardless of rows and columns

Number of families	1
Number of comparisons per family	28
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-2,958	-7,255 to 1,338	No	ns	0,5476
Ipsilateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-1,583	-5,880 to 2,713	No	ns	0,9994
Ipsilateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-0,9583	-5,255 to 3,338	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-0,1667	-4,760 to 4,427	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-0,2083	-4,505 to 4,088	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	0,2917	-4,005 to 4,588	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	0,5417	-3,755 to 4,838	No	ns	> 0,9999
Ipsilateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	1,375	-2,603 to 5,353	No	ns	0,9998
Ipsilateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	2	-1,978 to 5,978	No	ns	0,9547
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	2,792	-1,505 to 7,088	No	ns	0,6576
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	2,75	-1,228 to 6,728	No	ns	0,5397
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	-0,7280 to 3,25	7,228	No	ns	0,2398
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	-0,4780 to 3,5	7,478	No	ns	0,1456

Ipsilateral:Metformina	postMCAO	vs.					
Ipsilateral:Metformina pre-MCAO			0,625	-3,353 to 4,603	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO			1,417	-2,880 to 5,713	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO			1,375	-2,603 to 5,353	No	ns	0,9998
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO			1,875	-2,103 to 5,853	No	ns	0,9781
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO			2,125	-1,853 to 6,103	No	ns	0,9174
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO			0,7917	-3,505 to 5,088	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO			0,75	-3,228 to 4,728	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO			1,25	-2,728 to 5,228	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO			1,5	-2,478 to 5,478	No	ns	0,9991
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Contralateral:Control (Sham)			-0,04167	-4,338 to 4,255	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Contralateral:Control (Sham)			0,4583	-3,838 to 4,755	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Contralateral:Control (Sham)			0,7083	-3,588 to 5,005	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO)			0,5	-3,478 to 4,478	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO)			0,75	-3,228 to 4,728	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Contralateral:Metformina pre-MCAO			0,25	-3,728 to 4,228	No	ns	> 0,9999

14.7.2. ANOVA. NEUN, ESTRIADO

Compare cell means regardless of rows and columns

Number of families	1
Number of comparisons per family	28
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-121,7	-190,0 to -53,30	Yes	****	< 0,0001
Ipsilateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-80,88	-146,8 to -15,00	Yes	**	0,0051
Ipsilateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-69,79	-133,7 to -5,844	Yes	*	0,0207
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-14	-82,36 to 54,36	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-26,88	-92,76 to 39,00	No	ns	0,9967
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-36,61	-99,02 to 25,80	No	ns	0,8177
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control (Sham)	-53,92	-117,9 to 10,03	No	ns	0,195
Ipsilateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	40,79	-25,09 to 106,7	No	ns	0,738
Ipsilateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	51,88	-12,07 to 115,8	No	ns	0,2489
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	107,7	39,30 to 176,0	Yes	***	0,0001
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	94,79	28,91 to 160,7	Yes	***	0,0005
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	85,06	22,65 to 147,5	Yes	**	0,0012
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	67,75	3,802 to 131,7	Yes	*	0,0284

Ipsilateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO	11,09	-50,19 to 72,37	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO	66,88	1,004 to 132,8	Yes	*	0,0433
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO	54	-9,292 to 117,3	No	ns	0,1801
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO	44,27	-15,40 to 103,9	No	ns	0,4008
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Metformina pre-MCAO	26,96	-34,32 to 88,25	No	ns	0,9906
Contralateral:Control (Sham) vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO	55,79	-8,156 to 119,7	No	ns	0,1541
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO	42,91	-18,37 to 104,2	No	ns	0,5118
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO	33,18	-24,36 to 90,72	No	ns	0,8395
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Ipsilateral:Metformina postMCAO	15,88	-43,33 to 75,08	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO) vs. Contralateral:Control (Sham)	-12,88	-78,76 to 53,00	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Contralateral:Control (Sham)	-22,61	-85,02 to 39,80	No	ns	0,9995
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Contralateral:Control (Sham)	-39,92	-103,9 to 24,03	No	ns	0,7246
Contralateral:Metformina pre-MCAO vs. Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	-9,73	-69,40 to 49,94	No	ns	> 0,9999
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Contralateral:Control Positivo (SSN + MCAO)	-27,04	-88,32 to 34,25	No	ns	0,9902
Contralateral:Metformina postMCAO vs. Contralateral:Metformina pre-MCAO	-17,31	-74,84 to 40,23	No	ns	> 0,9999

14.8.

ANEXO 8. AVAL COMITÉ DE ÉTICA ANIMAL

ACTA DE AVAL A PRACTICA DEL AREA BIOMEDICA N° 016-015

Proyecto: **VALORACIÓN DE LOS EFECTOS CELULARES EXOFOCALES DE LA METFORMINA SUMINISTRADA CRÓNICAMENTE EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIO EN RATAS**

Línea

biomédica:

Sometido por:

Profesores: Efraín Buriticá Ramírez/Mauricio Palacios

022-015

Fecha en que fue sometido:

9

04

2015

Fecha Certificación CEAS:

12

08

2015

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha delegado en el Comité Institucional de Revisión de Ética con animales de experimentación biomédica (**CEAS**) mediante Resolución No. 27-A de Marzo 10 de 1997, el cual está regido por la Ley 84, de 1989 y la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, sobre protección de Animales en experimentación y con esa garantía de cumplimiento, se da el AVAL en los aspectos Éticos para la experimentación, establece las recomendaciones y exigencias que aparecen consignadas adelante.

Este Comité **certifica que:**

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

☒	Protocolo de Practicas	☐	Resultado de aval otros comités (si aplica)
☒	Formato de evaluación CEAS 01	☐	Cartas de las instituciones participantes
☒	Consentimiento Experto Veterinario	☐	Otro:

2. El presente proyecto fue evaluado y certificado por el Comité:

Según las categorías de riesgo establecidas en el manual de experimentación con animales de la Facultad de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo: B**

A	Procedimientos que no ocasionan malestar al animal o que lo minimizan.	B	Procedimientos que pueden causar molestias momentáneas y que se pueden obviar con la utilización de analgésicos o anestesia	C	Animales que serán sometidos a una manipulación significativa como cirugía, perfusión de órganos y que serán sacrificados al terminar el procedimiento o durante la ejecución del mismo.
D	Animales que serán sacrificados sin ningún tratamiento o manipulación de ensayo. (por ejemplo: para la obtención de tejidos, células, etc.	E	Otro no contemplado antes:		

3. Que los **procedimientos** que se proponen para proteger a los animales experimentales de la crueldad y sufrimiento, tienen cuidados humanizados que evita excesos o sufrimiento contra ellos.

Facultad de Salud

4. La forma de obtener las **licencias o permisos (si se requieren)**, presentados por los participantes en el estudio es adecuan a norma

El Comité, estará en la obligación de los siguientes procedimientos de control:

5. Este curso será **revisado** en su ejecución, si es seleccionado; el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los animales experimentales en este curso.
6. **Informará** oportunamente a las directivas institucionales:
- Todo desacato del responsable, a las orientaciones y solicitudes del Comité.
 - Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité, ante la negligencia en el tratamiento de los animales experimentales o actos anti-éticos.
7. **Reportará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
- Lesiones a animales experimentales por fuera de las estipuladas dentro del marco ético humanizado. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los animales experimentales u otras personas.
 - Cualquier cambio o modificación a las prácticas, que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
8. El presente proyecto ha sido **certificado** por un periodo de **12 meses** a partir de la fecha de la presente Acta. Los proyectos de duración mayor a 12 meses, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
9. El **Docente responsable deberá** informar al Comité de Ética con Animales de experimentación:
- Cualquier cambio que se proponga introducir a este curso. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los animales experimentales.
 - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los animales experimentales o asistentes a la práctica.
 - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, a la Vicedecanatura de investigaciones, secretario(a) y al presidente del Comité.
 - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los animales en experimentación.
 - cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - La terminación prematura o suspensión del curso explicando la razón para esto.
 - El Docente principal deberá presentar un informe al final del curso, indicando destinos de los sujetos experimentales, indicando cantidades procesadas; comportamiento de los animales experimentales.

NOTA: EXCLUSIVAMENTE PARA SER PRESENTADO ANTE CONVOCATORIA INTERNA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE 2015.

Firma:		
		
Nombre: FERNANDO CASTRO HERRERA		
Capacidad representativa:	PRESIDENTE	Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Proyecto: **VALORACIÓN DE LOS EFECTOS CELULARES EXOFOCALES DE LA METFORMINA SUMINISTRADA CRÓNICAMENTE EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIO EN RATAS**

Línea
biomédica:

Sometido por: **Profesores: Efraín Buriticá Ramírez**

Código Interno: **022-015**

Fecha en que fue sometido: **9**

04

2015

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle avala el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos Nacionales e Internacionales, de la Ley 84 de 1996 en defensa de los animales, en lo concerniente a los animales de experimentación y decretos reglamentarios relacionados y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:



Fecha:

12

08

2015

Nombre:

P/ ADALBERTO SÁNCHEZ G.

Capacidad
representativa:

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Teléfono: **5185680**

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arango-Dávila CA, Escobar MI, Buriticá E, Pimienta H. Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental: Una visión experimental y su correlato clínico. *Colomb Med.* 2008;39(3 SUPPL.):85–94.
2. Adriana Medina, Martha Escobar, Cesar Arango HP. Cambios exofocales en la expresión de parvoalbúmina Posterior a Isquemia Focal. 2002. p. 179–87.
3. Medina AM, García-Cairasco N, Escobar MI. Respuesta de una subpoblación de interneuronas y del transportador glial de glutamato GLT1 en la corteza contralateral a un foco isquémico. *Colomb Med.* 2008;39(3 SUPPL.):14–24.
4. Becerra L, Buritica E, Escobar M, Pimienta H. Overregulation of Alpha B Crystallin is a marker of reactive astrocytes in the acute response after cerebral contusion in humans. *J Neurochem* [Internet]. 2012;122(September):12. Available from: <http://ezproxy.newcastle.edu.au/login?url=http://ovidsp.ovid.com?T=JS&CSC=Y&N EWS=N&PAGE=fulltext&D=emed14&AN=70887960%5Cnhttp://library.newcastle.edu.au/resserv?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=10.1111%2Fj.1471-4159.2012.07849.x&issn=0022-3042&isbn=&volume=122>
5. Riascos D, Buriticá E, Jiménez E, Castro O, Guzmán F, Palacios M, et al. Neurodegenerative Diversity in human cortical contusion: Histological analysis of tissue derived from decompressive craniectomy. *Brain Res.* 2013;1537:86–99.
6. Riascos D, Guzmán F, Buriticá E, Palacios M, Escobar MI, Pimienta H. Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico. *Colomb Med.* 2008;39(3 SUPPL.):29–37.
7. Feigin VL, Barker-Collo S, Krishnamurthi R, Theadom A, Starkey N. Epidemiology of ischaemic stroke and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* [Internet]. 2010;24(4):485–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpa.2010.10.006>
8. Magkou D, Tziomalos K. Antidiabetic treatment, stroke severity and outcome. *World J Diabetes* [Internet]. 2014;5(2):84–8. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3990316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

9. Alan I. Faden, MD; Bogdan Stoica MD. Neuroprotection Challenges and Opportunities. *Arch Neurol*. 2007;64(June):794–800.
10. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* [Internet]. 2007;334(7586):197. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1781970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Cheng Y-Y, Leu H-B, Chen T-J, Chen C-L, Kuo C-H, Lee S-D, et al. Metformin-inclusive therapy reduces the risk of stroke in patients with diabetes: a 4-year follow-up study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2014;23(2):e99--105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24119365>
12. Elgebaly MM, Prakash R, Li W, Ogbi S, Johnson MH, Mezzetti EM, et al. Vascular protection in diabetic stroke: role of matrix metalloprotease-dependent vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2010;30(12):1928–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3002883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* [Internet]. 1989;20(1):84–91. Available from: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.STR.20.1.84>
14. Mehndiratta P, Chapman Smith S, Worrall BB. Etiologic Stroke Subtypes: Updated Definition and Efficient Workup Strategies. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2015;17(1):1–11.
15. Romero JR, Wolf PA. Epidemiology of Stroke: Legacy of the Framingham Heart Study. *Glob Heart*. 2013;8(1):67–75.
16. Lavados PM, Hennis AJM, Fernandes JG, Medina MT, Legetic B, Hoppe A, et al. Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean. *Lancet Neur* [Internet]. 2007;6(4):362–72. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442207700030>

17. Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 2009;276(1):13–26.
18. Kuntz M, Mysiorek C, Pétrault O, Pétrault M, Uzbekov R, Bordet R, et al. Stroke-Induced Brain Parenchymal Injury Drives Blood–Brain Barrier Early Leakage Kinetics: A Combined *in Vivo* / *in Vitro* Study. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2014;34(1):95–107. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2013.169>
19. Kuntz M, Mysiorek C, Pétrault O, Pétrault M, Uzbekov R, Bordet R, et al. Stroke-induced brain parenchymal injury drives blood-brain barrier early leakage kinetics: a combined *in vivo*/*in vitro* study. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2014;34(1):95–107. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3887349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Block F, Dihné M, Loos M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2005;75(5):342–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925027>
21. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* [Internet]. 2010;24(4):495–509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619862>
22. Denes A, Pinteaux E, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 and stroke: Biomarker, harbinger of damage, and therapeutic target. *Cerebrovasc Dis.* 2011;32(6):517–27.
23. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* [Internet]. 2010;24(4):495–509. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpa.2010.10.001>
24. Jun Li, Sharon E. Benashski, Venugopal Venna LM. Effects of Metformin in Experimental Stroke. *Stroke.* 2010;41(11):2645–52.
25. Mima Y, Kuwashiro T, Yasaka M, Tsurusaki Y, Nakamura A, Wakugawa Y, et al. Impact of Metformin on the Severity and Outcomes of Acute Ischemic Stroke in

- Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Stroke Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2016;25(2):436–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725260>
26. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2012;122(6):253–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3398862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 27. Jin Q, Cheng J, Liu Y, Wu J, Wang X, Wei S, et al. Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2014;40:131–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24632338>
 28. Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Machida T, Kaneshima S, Matsuo M, et al. Metformin induces up-regulation of blood-brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;433(4):586–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523792>
 29. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1 / AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. 2010;120(7):2355–69.
 30. Łabuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopień B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep* [Internet]. 2010;62(5):956–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098880>
 31. Arbeláez-quintero I, Palacios M. To Use or Not to Use Metformin in Cerebral Ischemia : A Review of the Application of Metformin in Stroke Rodents. *Stroke Res Treat*. 2017;2017.
 32. El-Mir M-Y, Demaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, et al. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2008;34(1):77–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18040888>

33. Correia S, Carvalho C. Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med Chem (Los Angeles)* [Internet]. 2008;4:358–64. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/mc/2008/00000004/00000004/art00009>
34. Li J, McCullough LD. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2010;30(3):480–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852687&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Kuramoto N, Wilkins ME, Fairfax BP, Revilla-Sanchez R, Terunuma M, Tamaki K, et al. Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* [Internet]. 2007;53(2):233–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2570046&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. McCullough LD, Zeng Z, Li H, Landree LE, McFadden J, Ronnett G V. Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 May;280(21):20493–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772080>
37. Jun Li, Sharon E. Benashski, Venugopal Venna LM. Effects of Metformin in Experimental Stroke. *Stroke*. 2010;41(11):2645–52.
38. Mccullough LD, Benashski SE. Preconditioning Induces Sustained Neuroprotection by Down Regulation of AMPK. *Neuroscience*. 2012;10(201):280–7.
39. Jiang T, Yu J-T, Zhu X-C, Wang H-F, Tan M-S, Cao L, et al. Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2014;171(13):3146–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611741>
40. Terpolilli N a, Moskowitz M a, Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2012;32(7):1332–46. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3390820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

z&rendertype=abstract

41. Liu Y, Tang G, Zhang Z, Wang Y, Yang G-Y. Metformin promotes focal angiogenesis and neurogenesis in mice following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* [Internet]. 2014;579:46–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026071>
42. Ashabi G, Khalaj L, Khodagholi F, Goudarzvand M, Sarkaki A. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2015;30(3):747–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25413451>
43. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2009;4(3).
44. Hu H, Gan J, Jonas P. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* (80-) [Internet]. 2014;345(6196):1255263–1255263. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1255263>
45. Prakash R, Li W, Qu Z, Johnson M a, Fagan SC, Ergul A. Vascularization pattern after ischemic stroke is different in control versus diabetic rats: relevance to stroke recovery. *Stroke* [Internet]. 2013;44(10):2875–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3827629&tool=pmcentre>
z&rendertype=abstract
46. Tykhomyrov A, Pavlova AS, Nedzvetsky VS. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): on the 45th Anniversary of Its Discovery. *Neurophysiology*. 2016;48(1):54–71.
47. Wagner DC, Scheibe J, Glocke I, Weise G, Deten A, Boltze J, et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):79–87.
48. Dent MAR, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett* [Internet]. 2010;584(13):2767–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.073>

49. Fudong Liua, b, Dorothy P. Schafera and LDM. TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Neurosci Methods*. 2009;(1):1–8.
50. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(February 1989):84–91.
51. Sun M, Deng B, Zhao X, Gao C, Yang L, Zhao H, et al. Isoflurane preconditioning provides neuroprotection against stroke by regulating the expression of the TLR4 signalling pathway to alleviate microglial activation. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(January):11445. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep11445>
52. Seto A, Taylor S, Trudeau D, Swan I, Leung J, Reeson P, et al. Induction of ischemic stroke in awake freely moving mice reveals that isoflurane anesthesia can mask the benefits of a neuroprotection therapy. *Front Neuroenergetics*. 2014;6(APR):1–9.
53. Durukan A, Tatlisumak T, Walker JM. Ischemic Stroke in Mice and Rats. Vol. 573, *Cardiovascular Genomics. Methods and Protocols*. 2009. 95-114 p.
54. Benedek A, Móricz K, Jurányi Z, Gigler G, Lévy G, Hársing LG, et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* [Internet]. 2006;1116(1):159–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16952339>
55. Struck MB, Andrutis K a, Ramirez HE, Battles AH. Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* [Internet]. 2011;50(3):344–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3103284&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
56. Garcia JH, Wagner S, Liu K-F, Hu X. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Stroke* [Internet]. 1995 Apr 1;26(4):627 LP-635. Available from: <http://stroke.ahajournals.org/content/26/4/627.abstract>
57. Goldstein LB, Davis JN. Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. *J Neurosci Methods* [Internet]. 1990;31(2):101–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2319810>

58. Ström JO, Ingberg E, Theodorsson A, Theodorsson E. Method parameters' impact on mortality and variability in rat stroke experiments: a meta-analysis. *BMC Neurosci* [Internet]. 2013;14(14):41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3637133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
59. Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* [Internet]. 2009;1(1):8. Available from: <http://etmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-7378-1-8>
60. Liu Y, Tang G, Li Y, Wang Y, Chen X, Gu X, et al. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2014;11:177. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4201919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Capettini LS a, Cortes SF, Lemos VS. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010;643(2–3):260–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624383>
62. Walcott BP, Miller JC, Kwon C-S, Sheth SA, Hiller M, Cronin CA, et al. Outcomes in severe middle cerebral artery ischemic stroke. *Neurocrit Care* [Internet]. 2014;21(1):20–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3880600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Ng KL, Gibson EM, Hubbard R, Yang J, Caffo B, O'Brien RJ, et al. Fluoxetine maintains a state of heightened responsiveness to motor training early after stroke in a mouse model. *Stroke*. 2015;46(10):2951–60.
64. Rewell SSJ, Churilov L, Sidon TK, Aleksoska E, Cox SF, Macleod MR, et al. Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat: Selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-centre preclinical trials. *PLoS One*. 2017;12(2):1–19.
65. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their

- application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3445–54.
66. Yuan Y, Guo Q, Ye Z, Pingping X, Wang N, Song Z. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res* [Internet]. 2011;1367:85–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.017>
 67. Zhou ZQ, Zhang GF, Li XM, Liu XY, Wang N, Qiu LL, et al. Loss of Phenotype of Parvalbumin Interneurons in Rat Prefrontal Cortex Is Involved in Antidepressant- and Propsychotic-Like Behaviors Following Acute and Repeated Ketamine Administration. *Mol Neurobiol.* 2015;51(2):808–19.
 68. Booker SA, Gross A, Althof D, Shigemoto R, Bettler B, Frotscher M, et al. Differential GABAB-Receptor-Mediated Effects in Perisomatic- and Dendrite-Targeting Parvalbumin Interneurons. *J Neurosci* [Internet]. 2013;33(18):7961–74. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1186-12.2013>