

Efecto del descenso de temperatura central producida por bupiriona e isorbide frente a hipoxia cerebral en *Rattus var. Norvegicus*

Luz M. Guerrero Espino¹, José Llanos Quevedo²

¹Facultad de Medicina Universidad Nacional de Trujillo, Perú, luzguerrero-61@hotmail.com

²Facultad de Biología Universidad Nacional de Trujillo, Perú, jllanosq@yahoo.com

Recibido: 13-08-2013

Aceptado: 21-10-2013

RESUMEN

La disminución de la temperatura central en individuos que sufren isquemia cerebral es un camino efectivo para reducir los daños neurológicos. En esta investigación se trató de disminuir la temperatura central sin generar respuesta regulatoria, mecanismo fisiológico denominado anapirexia. Se utilizó para este fin terapia farmacológica, con drogas cuya acción molecular sea semejante al anapirexico, es decir, activación de las vías de serotonina – AMPc y de óxido nítrico-GMPc en el área pre óptica hipotalámica usando la asociación de bupiriona y dinitrato de isorbide en modelo de isquemia cerebral focal en ratas, machos de 8 semanas de edad, con 200 gr de peso. A fin de terminar su efecto neuroprotector las ratas fueron distribuidas en cinco grupos: Grupo I (Sham o pseudo operado), Grupo II (operado), Grupo III (operado mas bupiriona 4mg/kg administrado por vía oral), Grupo IV (operado más dinitrato de isorbide 20mg/día administrado por vía oral), Grupo V (operado más la administración de ambas drogas). Se encontró descenso de 1°C en el grupo tratado con bupiriona (Grupo III), descenso de 2.5°C en el grupo tratado con isorbide (Grupo IV) y descenso de 4°C en el grupo en el que se usó ambas drogas (Grupo V) con $p < 0.01$. A las 24 horas de aplicado el modelo experimental se realizó el estudio histopatológico de los cerebros, encontrando menor daño neurológico en todos los grupos en donde se usaron las drogas (Grupos III, IV y V) y el menor daño en el grupo V, con $p < 0.01$. Se concluye que el mejor efecto neuroprotector se presentó con la asociación de bupiriona y dinitrato de isorbide (Grupo V) con un descenso de 4°C de la temperatura colónica, seguido de isorbide y bupiriona cuando se aplicaron individualmente.

Palabras clave: *isquemia cerebral focal, isorbide, bupiriona, neuroprotección.*

ABSTRACT

The decrease in core temperature in individuals suffering cerebral ischemia is an effective way to reduce neurological damage, so in this paper we tried to reduce the core temperature without generating regulatory response, called anapirexia physiological mechanism using drug therapy, with drugs whose action is similar to anapirexico molecular ie activation of serotonin pathways - nitric oxide cAMP and cGMP-optical pre hypothalamic area for which we use the association of buspirone and isosorbide dinitrate in focal cerebral ischemia model in rats, male 8 week old, weight 200 g, divided into five groups: Group I (or pseudo Sham operated), Group II (operated), Group III (operated more 4mg/kg buspirone administered orally) Group IV (operated more isosorbide dinitrate orally administered 20mg/day), Group V (operated over the administration of both drugs) in order to complete its neuroprotective effect. Found drop of 1 ° C in the group treated with buspirone (Group III), decrease 2.5 ° C in the group treated with isosorbide (Group IV) and decrease of 4 ° C in the group that used both drugs (Group V) with $p < 0.01$. At 24 hours after applying the experimental model was performed histopathological study of the brain, finding minor neurological damage in all groups where drugs were used (Groups III, IV and V), and the least harm in group V, with $p < 0.01$. We conclude that the best neuroprotective effect was presented with the association of buspirone and isosorbide dinitrate (Group V), a decrease of 4 ° c of colonic temperature, followed by isosorbide and buspirone when applied individually.

Keywords: Focal cerebral ischemia, buspirone, isorbide, neuroproteccion.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades vasculares cerebrales son la primera causa de incapacidad permanente en adultos y la tercera causa de muerte en los países desarrollados. Aproximadamente el 30% de los pacientes que ha sufrido un infarto cerebral queda con incapacidades graves o permanentes y la mayor parte del resto de los supervivientes presenta dificultades funcionales (Sacco, 2007: 331).

Se trata de una patología con una gran repercusión e importancia social al suponer una carga económica muy elevada. Además, conforme la población envejece, su prevalencia aumenta.

En los organismos aeróbicos, el oxígeno es el final aceptor de electrones en el metabolismo oxidativo, por lo que es esencial mantener su flujo a través de la cadena respiratoria, la síntesis de ATP y consecuentemente, la función celular (Gordon, 2001: 81). La falta de oxígeno representa una situación amenazante para todas las especies aeróbicas. Una manera de disminuir los daños celulares inducidos por la hipoxia es la reducción de la temperatura corporal, la cual protege a tejidos sensitivos como el corazón y cerebro por disminución en la formación de radicales libres, metabolitos químicos y edema tisular (Wood, 1995: 71; Krogh, 2004: 491; Wang, 2000: 3462).

La isquemia cerebral es el proceso fisiopatológico caracterizado por la disfunción de una porción de tejido cerebral secundaria a la disminución del flujo de oxígeno en una arteria cerebral concreta. La evolución de la isquemia que persiste por debajo de un umbral de flujo conlleva la necrosis del tejido y el desarrollo de un infarto cerebral. Esta isquemia cerebral es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad y genera una enorme carga económica en las familias de los enfermos y en la sociedad (Arango, 2004: 156).

La gran importancia del estudio de la isquemia se debe a la gran trascendencia social que tiene, debido a la carencia de tratamientos eficaces, lo que explicaría el interés actual por la investigación en este campo.

Varias especies animales, incluyendo ectotermos y endotermos reducen su temperatura cuando se exponen a hipoxia, como consecuencia de un reseteo hacia abajo del punto de ajuste termorregulador, sin una respuesta termogénica y/o conductual. A este mecanismo de hipotermia regulada se denomina anapirexia (Wood, 1991: 71; Hill, 1998: 352).

Steiner (2002: 1422) presentó una de las primeras propuestas del mecanismo neuroquímico de anapirexia inducida por hipoxia, la cual resulta de la activación de las vías de serotonina-AMPC y óxido nítrico-GMPc en el área pre óptica. El modelo propuesto, representa la vía común final de todos los mediadores de anapirexia. El incremento de la liberación de serotonina (5-HT) y óxido nítrico (ON) y los niveles intracelulares de AMPC y GMPc respectivamente, incrementaría la sensibilidad térmica de las neuronas de calor de la región pre-óptica originando una disminución del set point termorregulador.

La anapirexia favorece la recuperación electro fisiológica por un proceso asociado con cambios en los niveles de ATP y una desviación hacia a la izquierda de la curva de disociación de la Hemoglobina con el incremento del flujo de oxígeno en los pulmones (Wang, 2000: 3462; Wagner, 2002: 354; Yenari, 2008: 2910).

La llave de la supervivencia bajo estas condiciones parece ser inherente a la habilidad de disminuir ("down regulation") la tasa metabólica celular a un nuevo nivel hipo metabólico y una manera de balance entre la demanda y oferta de ATP (Boulant, 1998: 108; Barros, 2002: 975; Boutilier, 2001: 3171).

Durante la aplicación de hipotermia forzada, no ocurre desviación de la temperatura hipotalámica central, por lo que es acompañado con la posterior estimulación de mecanismos de producción y conservación de calor creando un estrés fisiológico y psicológico; estas desventajas no se producen en la anapirexia (Steiner, 2002: 584).

En la clínica, la eficacia de la hipotermia se manifiesta al disminuir los daños neurológicos en supervivientes al coma y en la isquemia hipóxica neonatal, considerando que una disminución de 2 a 4°C protegen al tejido frente a la disminución de oxígeno (Briley, 1984: 125; Boulant, 1998: 108; Delivoria, 1998: 132; Debillon, 2003: 17; Schwab, 1997: 762; McDonagh, 2006: 180; Lei, 1994: 147; Holzer, 2003: 317).

Investigaciones en animales que hacen hipotermia regulada presentaron vasodilatación periférica y reducción de tasa metabólica. La evidencia acumulada nos muestra que la disminución de la temperatura central es una forma efectiva para reducir los daños celulares. En bases a esta racionalidad, la hipotermia forzada (uso de medios físicos) es usada en clínica y en procedimientos quirúrgicos para proteger el cerebro y el corazón de los efectos de deterioro de la hipoxia. Así mismo, es un método usado en el estudio y tratamiento de patología humana (Miñambres, 2008: 227; Sahuquillo, 2007: 2310; Steiner, 2002: 263; Gordon, 2001: 81; Liu, 2009: 387).

Bajo este contexto, es que nos propusimos combinar el uso de drogas agonistas de 5-HT_{1a} con donadores de ON (buspirona e isorbide) para inducir anapirexia en ratas albinas, *Rattus var. Norvegicus* y determinar los efectos protectores aplicando el método de Isquemia Cerebral Focal, ICF (Sugio y Pulsinelli, 1998: 992).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Objeto de estudio

El objeto de estudio del presente trabajo estuvo constituido por Ratas albinas, *Rattus var. Norvegicus* machos, de 8 -9 semanas de edad, con peso promedio de 200 ± 20 gr, obtenidos del bioterio de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú, después de una semana de cuarentena en el laboratorio de Fisiología de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Se cumplieron estrictamente las normas establecidas por los Protocolos de Ética para manejo de animales de experimentación (APS, 2002: 281; Jayo, 1999; ILAR, 1996).

Según tratamiento estadístico (Montgomery, 2002: 647; Steel, 1996) se seleccionó 80 animales distribuidos en 5 grupos de 16 ratas cada uno, distribuidos de la siguiente manera:

Grupo I Sham: grupo que se operó pero no se produjo lesión cerebral (grupo control).

Grupo II sin tratamiento: grupo que se operó, se produjo la lesión y no se le dio tratamiento. Sirvió para verificar el efecto del modelo experimental empleado.

Grupo III: grupo que se operó, se produjo la lesión y recibió tratamiento con la buspirona.

Grupo IV: grupo que se operó, se produjo la lesión y recibió tratamiento con la droga dinitrato de isorbide.

Grupo V: grupo que se operó, se produjo la lesión y recibió tratamiento combinado de ambas drogas.

2.2 Métodos y técnicas

Las ratas albinas se mantuvieron en condiciones estándar de iluminación (ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a una temperatura ambiente de 24-25° C, con dieta estándar para la especie usada y agua ad libitum (Jayo, 1999; Rollin, 1995; Quezada, 1997).

Producción de hipoxia

Se aplicó el Modelo experimental de **Isquemia Cerebral Focal (ICF)** propuesto por Sugio y Pulsinelli (1998: 992) modificado por los autores. Se anestesió a los animales con una dosis de 5 mg/kg de hidrocloreuro de xilazina (Calier) y 50 mg/kg de clorhidrato de Ketamina y se les dejó reposar hasta que los anestésicos hicieran efecto. Por punción cardiaca se le extrajo a cada rata el 10% del volumen de sangre circulante (Prieto, 2008: 414). Bajo condiciones de asepsia y antisepsia, se realizó una incisión en la línea media del cuello y diseccionó la piel, tejido subcutáneo y músculo hasta lograr identificar la arteria carótida común (ACC) izquierda y se ligó con sutura Nylon 5-0. Para interrumpir la circulación sanguínea de manera ipsilateral, se suturó la herida con ayuda de un anestésico local y posteriormente, se administró gentamicina (Abbott) como profiláctico. Finalmente, se dejó descansar al animal a una temperatura ligeramente mayor a la ambiental en cámaras previamente confeccionadas (Sugio, 1998: 992; Roda, 1998; Lopez-Hernandez, 2005: 160; Prieto, 2008: 416).

Control de temperatura

Se registró la temperatura central cada 10 minutos con termómetros digitales, instalando termistores rectales (3cm) durante una hora antes de iniciada la experiencia para lograr la adaptación del animal y evitar el efecto estrés y posteriormente por 24 horas.

Suministro de drogas

Se administró Buspirona (Sigma-Aldrich) a una dosis de 4mg/kg por VO, utilizando sonda orogástrica y dinitrato de isorbide sodio (Normon) a una dosis de 20 mg. por VO, inmediatamente después de la cirugía. Las dosis de las drogas se definieron en base a estudios pilotos previos que realizó el investigador para evaluar los efectos termorreguladores de estas drogas en los animales de experimentación.

Obtención y preparación del material de estudio

Remoción del cerebro. Luego de 24 horas de realizada la cirugía los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (Ketamina). Se procedió a la decapitación en un nivel justo por encima de las escapulas. Una vez que la cabeza fue removida se expuso el interior del cráneo separando los huesos nasales y frontales en sentido sagital, para luego extraer los huesos de la bóveda craneana. Después se extrajo con cuidado el encéfalo y se sumergió en formol al 10% para su conservación (Sugio, 1998:922; Pulsinelli, 1979: 270).

Evaluación del daño histopatológico. Los cerebros fijados en solución de formol y embebidos en parafina se sometieron a la tinción con hematoxilina-eosina. A fin de poder evaluar comparativamente todas las muestras, se realizaron secciones coronales de cerebro en tres regiones (Neocortex, Hipocampo, ganglios basales) por ser las áreas más vulnerables a daño en una lesión isquémica. En la región del hipocampo se analizó las características de las neuronas oscuras (contracción celular prominente, basofilia, dendritas apicales en sacacorchos) mientras que en el neocortex y los ganglios basales se analizó las características de las neuronas rojas (citoplasma brillante, rojo o rosado, núcleo picnótico desintegrado, dendritas apicales en sacacorchos, nucléolo poco notorio, gránulos de nissl poco notorios, contracción celular prominente). Para determinar el daño se realizó un conteo de las características alteradas en cada una de las áreas del cerebro de cada animal que permitieron establecer diferencias significativas entre grupos, aplicando la prueba de Levine (Quinzaños, 2008: 119; Arch, 2008: 6; Busto, 1987: 729).

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con los paquetes estadísticos SPSS 15.0 y Minitab Statistical Software previa elaboración de la base de datos correspondiente. Para las variables cuantitativas se calculó el promedio y su correspondiente varianza, realizándose gráficos de barras simples para resaltar los hallazgos de interés. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de una distribución y luego se determinó si existe diferencia significativa entre los promedios de los grupos, para esto se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA); si existe diferencias significativas (p -valor < 0.05), quiere decir que al menos dos comparaciones son diferentes.

III. RESULTADOS

3.1 SUPERVIVENCIA

Durante el desarrollo del experimento fallecieron 2 ratas en total, 1 perteneciente al grupo ICF y la otra perteneciente al grupo ICF+B. Las ratas restantes no tuvieron complicaciones y pudieron llegar al final de experimento.

En la Fig.1 se muestra la disminución de 1°C en el grupo que se administró buspirona (ICF-B), con un $p < 0.01$, un descenso de 2.5°C y un $p < 0.01$ en el grupo ICF-I y un descenso de 4°C con un $p < 0.01$, en el grupo ICF+B+I, altamente significativo de las primeras 12 horas.

Las Figs. 1, 3, 4, 5 representan las características neuronales que indican daño celular en tres zonas del cerebro (Neocortex, hipocampo y ganglio basal) en cada uno de los grupos, provocado por el modelo experimental.

La muestra con daño histológico nos mostró que el grupo ICF o control presentó una media del número de disconformidades de 6.4 con un error típico de 0.68, mientras que el grupo ICF+BI, presentó una media del número de disconformidades de 3.67 con un error típico de 0.67. El grupo Sham obtuvo una media del número de disconformidades de 3.2. El grupo ICF+I presentó una media del número de disconformidades de 3.4 con un error típico 0.6, el grupo ICF+B+I, presentó una media del número de disconformidades de 3.3 con un error típico de 0.62.

En la comparación entre grupos, se encontró diferencias altamente significativas entre los grupos Sham e ICF (control) y altamente significativo, $p < 0.001$ entre el grupo ICF (control) y grupo ICF+B+I.

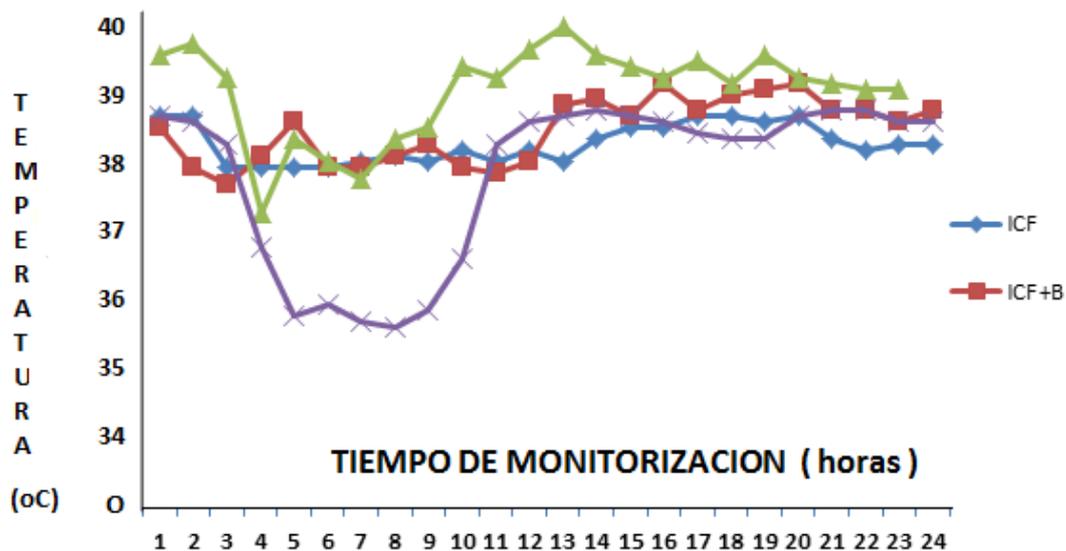


Fig.1 Efecto de las drogas Buspirona (B), Isorbide (I) ambas (B+I) sobre la Temperatura colónica comparada con el Basal I (ICF).

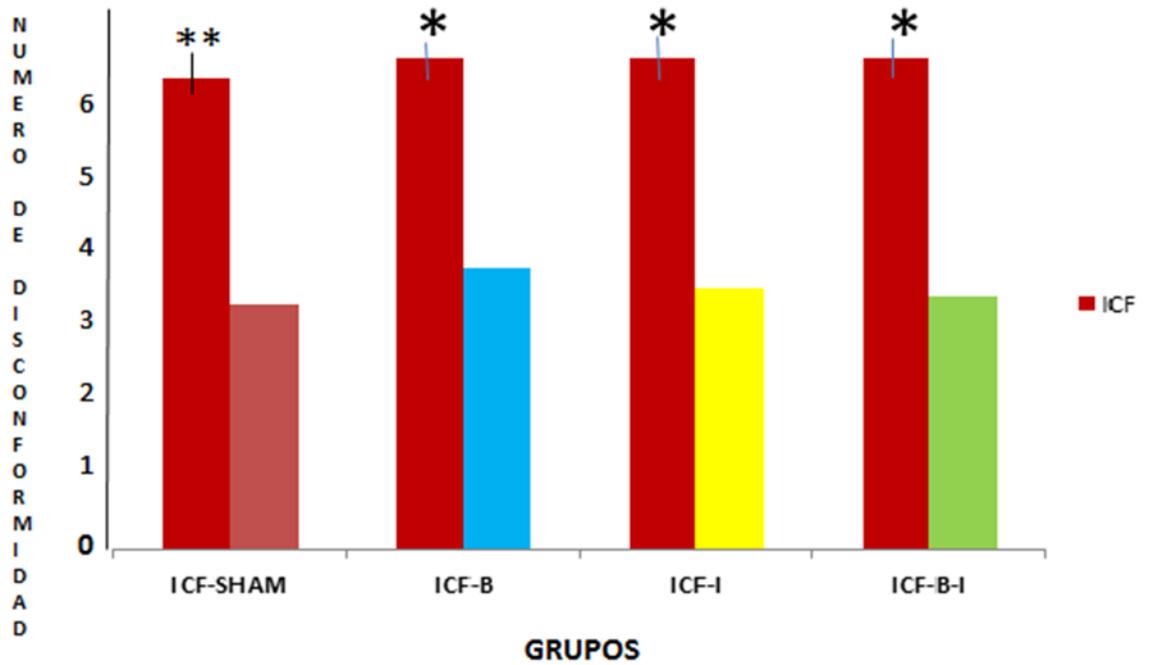


Fig. 2. Representación gráfica de las medias del número de disconformidades que evidencian los daños neurológicos en los Grupos SHAM-ICF, ICF-B (buspirona), ICF-I (isorbide), ICF-B-I (buspirona-isorbide).

* $p < 0.01$,
** $p < 0.001$.

Daño neurológico (histopatología)

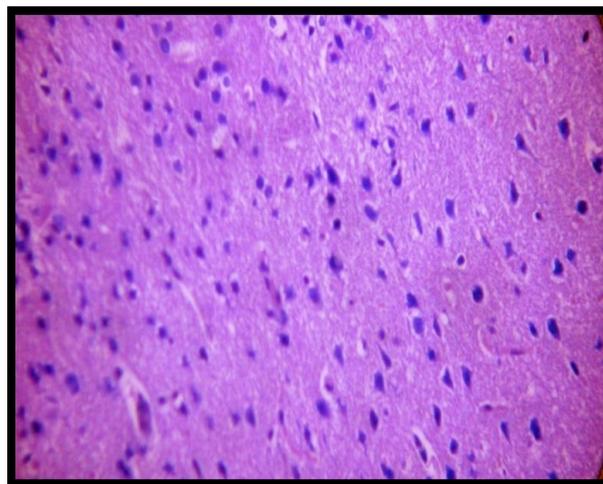


Fig.3. Corte histológico de neuronas oscuras del hipocampo- Grupo Sham usando tinción de hematoxilina eosina (400 x).

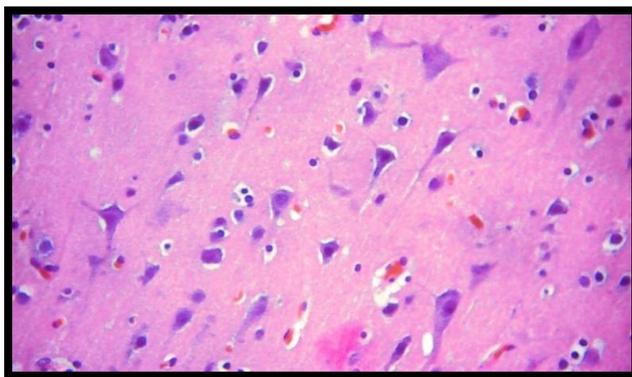


Fig. 4. Corte histológico de neuronas rojas mostrando **contracción celular** prominente en Neocortex cerebral – Grupo ICF usando tinción de hematoxilina eosina (400 x).

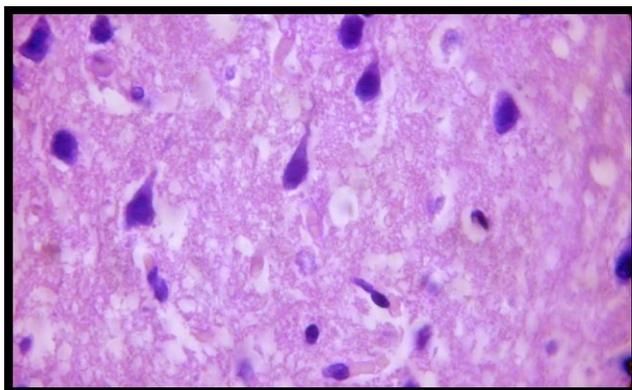


Fig. 5. Corte histológico en neuronas oscuras del hipocampo mostrando dendrita apical en sacacorchos en Grupo ICF-B-I usando tinción de hematoxilina eosina (400 x).

IV. DISCUSIÓN

En la presente investigación se enfocan los resultados de dos maneras. En la Fig. 1, se evidencia el efecto hipotérmico de las drogas en forma individual y asociadas comparándola con el grupo ICF y en la Fig. 2, se presenta los resultados de la evaluación histológica a que fueron sometidos los cerebros de los animales en áreas sensibles a la falta de oxígeno, como son Neocortex, hipocampo y ganglios basales.

La Fig.1 mostró que en el grupo ICF-B se observa disminución de 1°C con $p < 0.01$. Esta droga es un agonista selectivo a nivel de los receptores post-sinápticos de 5-HT_{1A} y origina elevación de serotonina; datos que coinciden con investigaciones realizadas por Navinés de la Cruz (2005) y Expósito (1994) quienes encontraron una respuesta hipotérmica significativa.

Se presenta también en el grupo ICF-I un descenso de 2.5°C con un $p < 0.01$ comparado con el grupo ICF. Esta droga estimula la liberación de óxido nítrico, activando la guanilato ciclasa y aumentando los niveles de GMPc que produce efecto vasodilatador y permite al organismo perder calor por convección y finalmente, se observó que al combinar las drogas grupo ICF-B-I, se provocó un descenso de la temperatura central de 4°C con un $p < 0.001$, altamente significativo, lo que se explicaría por la sinergia de los mecanismos de ambas drogas, aumento del AMPc celular y de GMPc intracelular simultáneamente, se genera el efecto anapirexico, respuesta del sistema nervioso central compensatoria y regulada, que reduce el consumo de oxígeno, aumenta la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, y mitiga las respuestas a la hipoxia. Se han sugerido varias sustancias

además, como mediadores putativos, entre ellas adenosina, lactato, opioides y la mayoría parece actuar en el sistema nervioso central (Steiner, 2002; Barros, 2002).

Con estos hallazgos confirmamos en un primer momento, que las drogas semejan el mecanismo neuroquímico propuesto por Steiner (2002): una elevada producción de AMPc y GMPc en el área pre óptica hipotalámica disminuye el punto de consigna termorreguladora, es decir, anapirexia.

La segunda parte de los resultados, Fig. 3, 4, 5, grafica la identificación histopatológica de las características neuronales, denominadas disconformidades, que indican daño celular en tres zonas del cerebro (Neocortex, hipocampo y ganglio basal) y se observa que el grupo donde se presentó el mayor daño neuronal fue el grupo ICF o control ($p < 0.001$) y el de menor daño el grupo ICF+B+I, con un $p: 0.01$, lo que confirma que el efecto de buspirona y dinitrato de isorbide, al bajar hasta 4°C la T colónica, genera efecto protector del tejido nervioso.

Sin embargo, también cabe resaltar que los resultados que se presentan en los grupos ICF-B e ICF-I de manera independiente presentan también disminución de temperatura colónica, así como efecto neuroprotector, aunque el mayor efecto hipotérmico y neuroprotector ($p < 0.001$) se presenta en el grupo en donde se asocian ambas drogas (ICF-B-I).

El mecanismo protector propuesto es que la hipotermia disminuye la velocidad de peroxidación de lípidos y protege del estímulo isquémico a las membranas celulares mediante la estabilización de eflujo de potasio (Lei, 1994; Coulbourn, 1997; Holzer, 2002; Schwab, 1997; Guzmán, 2008).

En cuanto al aspecto molecular que genera la hipotermia, es la de atenuar la activación de las vías SAPK que se producen en hipoxia y que desencadenan la muerte celular; esta atenuación se debe a una mayor modulación inmune y mejora de las defensas antioxidantes tales como, aumento de las concentraciones cerebrales de ascorbato, que generan efectos a favor de regeneración neuronal y/o sinaptogénica (Drew, 2004; Lee et al, 2002; Zhou et al, 2001).

La hipotermia, inducida bajo condiciones controladas, disminuye el daño neurológico en modelos animales como en seres humanos después de paro cardíaco (Busto et al, 1987), aunque los mecanismos multifactoriales de protección son aún poco conocidos (Holzer y Sterz, 2003). La

magnitud de refrigeración puede mejorar la protección hasta el límite de tolerancia que al frío se alcanza. Por lo tanto, una mayor tolerancia a la disminución de la temperatura corporal central debido a las adaptaciones a nivel celular, pueden desempeñar un gran papel en la tolerancia a la hipoxia como la respuesta metabólica hipóxica, ya que este último requiere una temperatura mínima de cuerpo de núcleo para ser eficaz (Yenari, 2008; Zhou, 2001).

El grado de hipotermia también se refleja en un efecto neuroprotector, de manera que una disminución moderada de la temperatura corporal (4-6 °C); es más eficaz que una disminución leve (1-3°C) lo que confirmamos con nuestros hallazgos (Fig.5) mientras que una hipotermia profunda (menos 15-20 °C) puede producir efectos secundarios importantes (Nguyen, 2011).

Los mecanismos neuroprotectores de la hipotermia son múltiples: disminuye el consumo cerebral de oxígeno, enlentece la disminución de fosfocreatina/fósforo en la activación de los aminoácidos excitadores, inhibe la actividad de la sintetasa del óxido nítrico, disminuye el nivel de interleukina-1 β , disminuye la liberación de citoquinas tóxicas por la microglia/glia, suprime la actividad de los radicales libres, suprime la apoptosis y disminuye la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la presión intracraneal y el edema cerebral (Holzer, 2002; Holzer, 2003).

Los efectos combinados de la hipotermia con mecanismos antioxidantes mejorados, mecanismos de defensa, la atenuación de la respuesta inflamatoria, así como el suministro de oxígeno mejorado, por tanto, tienen el potencial de proporcionar una protección significativa contra la hipoxia (Markstein, 1999; Lee, 2002; Talati, 2005).

Aunque todavía hay muchas áreas de investigación sobre los mecanismos de neuroprotección de la hipotermia, podemos concluir que el uso combinado de los agonistas de 5-HT_{1A}, buspirona, con los donantes de óxido nítrico, dinitrato de isorbide, que se utilizan actualmente en los pacientes como fármacos ansiolíticos y vasorrelajantes, respectivamente, pueden inducir anapirexia y neuroprotección.

V. CONCLUSIONES

- ❖ La bupiriona produce efecto neuroprotector a una dosis de 4mg/kg con un descenso de 1°C de temperatura colónica.
- ❖ El isorbide produce efecto neuroprotector a una dosis de 20 mg/día con un descenso de 2.5°C de temperatura colónica.
- ❖ El mayor efecto neuroprotector se presenta con la asociación de las drogas, bupiriona y dinitrato de isorbide, con un descenso de 4°C de temperatura colónica.
- ❖ El mejor efecto neuroprotector se observó en el estudio histopatológico del cerebro de ratas tratadas con bupiriona y dinitrato de isorbide donde se encontraron el menor número de disconformidades.

VI. RECOMENDACIONES

- ❖ Se deben monitorizar los efectos colaterales y secundarios de las drogas usadas antes de ser aplicadas como terapia clínica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCH, E., VERDUZCO, A., SANCHEZ, P., GONZALES, R., LICONA, J., MOTA, D. 2008. **Efectos de la ligadura de la arteria carótida común en los valores gasométricos en cobayos.** *An Orl Mex*; 53:6-12.
- ARANGO-DAVILA, C., ESCOBAR-BETANCOURT, G. P., CARDONA-GOMEZ, H., PIMIENTA-JIMENEZ. 2004. **Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica.** *Rev Neurol*; 39(2):156-65.
- AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. 2002. **Guiding principles for research involving animals and humans beings.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R281- R283.
- BARROS, R., BRANCO, L. 2002. **Central dopamine modulates anapirexia but not hyperventilation induced by hypoxia.** *J Appl Physiol* 92: 975-981.
- BOULANT, J. 2000. **Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever.** *Clin Infect Dis* 31: S157-S161.
- BOULANT, J. A. 1998. **Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature.** *Ann NY Acad Sci* 856: 108-115.
- BOUTILIER, R. G. 2001. **Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia.** *The Journal of Experimental Biology* 204, 3171–3181
- BRILEY, J. B., GRAHAM, DI. 1984. **Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system.** In Adams JH, Corsellis JAN, Duncen LW, editors: *Greenfield's Neuropathology*, 4 Ed. New York: John Wiley & Sons; p. 125-207.
- BUSTO, R., DIETRICH, W. D., GLOBUS, M. Y., VALDES, I., SCHEINBERG, P., GINSBERG, M. D. 1987. **Small differences in intranscemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 729-738.
- COULBOURN, F., SUTHERLAND, G., CORBETT, D. 1997. **Postischemic hypothermia-a critical appraisal with implications for clinical treatment.** *Molec Neurobiol*; 14:171–201.
- DREW, K, *ET al.* 2004. **Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms.** *The Journal of Experimental Biology* 207, 3155-3162.

- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., MISHRA, O. 1998. **Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention.** *J Pediatr*; 132: 30-4.
- DEBILLON, T., DAOUD, P., DURAND, P. 2003. **Whole-body cooling after perinatal asphyxia: a study in term neonates.** *Dev Med Child Neurol*; 45: 17-23.
- EXPOSITO, M. 1994. **Estudio farmacológico de una nueva serie de análogos tiofénicos de la tianeptina.** [Tesis Doctoral]. Madrid: Instituto de Química Médica de Madrid; pag.125.
- GORDON, C. 2001. **The therapeutic potential of regulated.** *Emerg. Med. J.* 18; 81-89
- GUZMAN, M. 2008. **Estudio del efecto neuroprotector de tratamientos farmacológicos en un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica de médula espinal de rata basado en cultivos organotípicos** [tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- HILL, MD., HACHINSKI, V. 1998. Stroke **treatment: Time is brain.** *Lancet*.352 (Suppl): 10-14.
- HOLZER, M., CERCHIARI, E., *et al.* 2002. **Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest.** *N Engl J Med* 346: 549-556.
- HOLZER, M., STERZ, F. 2003. **Therapeutic hypothermia after cardiopulmonary resuscitation.** *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 1, 317-325.
- INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (ILAR). 1996. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.** National Academy Press, Washington, DC.
- KROGH, A. 2004. **The quantitative relationbetween temperature and standard metabolism in mammals.** *Int. Z. Phys. Chem. Biol.* 1:491–508
- JAYO, MJ.; CISNEROS, J. 1999. **Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.** Institute of Laboratory Animal Resources. México.
- LEI, B.; TAN, X.; CAI, H. *et al.* 1994. **Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation.** *Stroke* ;25:147–52.
- LEE, M.; CHOI, I. and PARK, K. 2002. **Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation.** *J. Neurochem.* 82, 867-873.
- LIU, L.; YENARI, MA. 2009. Review **Combination therapy with hypothermia for treatment of cerebral ischemia.** *J Neurotrauma.* Mar; 26(3):325-31.
- LIU, L.; YENARI, MA. 2009. Review. **Hypothermia after acute ischemic stroke.** *J Neurotrauma.* 26(3):387-91.
- LOPEZ-HERNANDEZ, M.; SOLIS, H. 2005. Cerebral **ischemia: some secondary alterations and animal models.** *Arch Neurocién (Mex).* Vol. 10, No. 3: 160-167.
- MCDONAGH, D. 2006. **Induction of Hypothermia after Intraoperative Hypoxic Brain Insult.** *Anesth Analg.* Vol. 103, No. 1, July 103:180 –1.
- MARKSTEIN, R.; MATSUMOTO, M.; KOHLER, C.; TOGASHI, H.; YOSHIOKA, M. and HOYER, D. 1999. **Pharmacological characterisation of 5-HT receptors positively coupled to adenylyl cyclase in the rat hippocampus.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 454-459.
- MIÑAMBRES, E; HOLANDA, M.; DOMINGUEZ, A. y RODRIGUEZ, J. 2008. **Hipotermia terapéutica en pacientes neurocríticos .***Med Intensiva.* 32(5):227-35.
- MONTGOMERY, D. 2002. **Diseño y Análisis de Experimentos.**2da edición. Editorial Limusa.pag 647.
- NAVINES DE LA CRUZ, R. 2005. **Hipotermia, respuesta hormonal y respuesta opioide asociadas a receptores 5-ht1a en la depresión mayor pre y post tratamiento antidepressivo.** [Tesis doctoral].Barcelona.Universidad Nacional de Barcelona.

- NGUYEN, A.2011. **Molecular Mechanisms Of Neuroinflammation Following Global Cerebral Ischemia: The Role of Hypothermia Therapy** [Thesis doctoral]. Toronto: Institute of Medical Science University of Toronto.
- PRIETO-ARRIBAS, R., MORENO-GUTIERREZ, A.; SIMAL-HERNANDEZ, B. 2008. **Modelos experimentales de isquemia cerebral**. *REV NEUROL* 47: 414-26
- PULSINELLI, WA., BRIERLY, J. 1979. **A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat**. *Stroke*. 10: 267-72.
- QUEZADA, A. 1997. **Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies**. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Unidad de Ciencias Biomédicas México.
- QUINZAÑOS, J., CORONADO, R.; ARCH, T.*et al.* 2008. **Efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas**. *Cir Ciruj* 2008; 176:119-125.
- RODA, J., PASCUAL, J. *y col.* 1998. **Modelos experimentales en isquemia cerebral**. *Neurología* Vol 13, No: 9.
- ROLLIN, B., KESEL, M.1995. **The Experimental Animal in Biomedical Research**. Volume II: Care, Husbandry, and Wellbeing, an Overview by Species. eds. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- SACCO, R., CHONG, J., PRABHAKARAN, S.; ELKIND, M. 2007. **Experimental treatments for acute ischaemic stroke**. *Lancet* 369: 331-41.
- SAHUQUILLO, J., VILLALTA, A.2007. **Cooling the injured brain: how does moderate hypothermia influence the pathophysiology of traumatic brain injury**.2007. *Curr Pharm Des*. 13:2310-22.
- SHANKARAN, S., LAPTOOK, A. 2003. **Challenge of conducting trials of neuroprotection in the asphyxiated term infant**. *Semin Perinatol*; 27: 320-32.
- STEINER, A., ROCHA, M. and BRANCO, L. 2002. **A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia**. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1412-R1422, 2002? First published August 15.
- STEINER, A., BRANCO, L. 2002. **Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators**. *Annu Rev Physiol* 64: 263-288.
- STEINER, A., ANTUNES-RODRIGUES, J and BRANCO, L.2002. **Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response**. *Brain Res* 944:135-145.
- STEINER, A., ANTUNES-RODRIGUES, J., McCANN, S., BRANCO, L. G. S. 2002. **Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain**. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R584-R593.
- STEEL, R., TORRIE, J. 1996. **Principios y Procedimientos de Bioestadística**.Mc Graw-Hill. Mexico. 2da Edicion.
- SCHWAB, S., SPRANGER, M., ASCHOFF, A., STEINER, T., HACCKE, W. 1997. **Brain temperature monitoring and modulation in patients with severe MCA infarction**. *Neurology* 48: 762-767.
- SUGIO, K., HORIZOME, N., SAKAGUCHI, T., GOTO, M. 1998. **A new model of bilateral hemispheric ischemia-modified four-vessel occlusion in rats**. *Stroke* . 19: 922.

- TALATI, A., YANG, W., YOLTON, K. 2005. **Combination of early perinatal factors to identify near-term and term neonates for neuroprotection.** J Perinatol 2005; 25: 245-50.
- WANG, J., CHAMBERS, G., COTTRELL, J., KASSL, S. 2000. **Differential fall in ATP accounts for effects of temperature on hypoxic damage in rat hippocampal slices.**J. Neurophysiol. 83(6):3462-72
- WAGNER, B., NEDELCO, J., MARTIN, E. 2002. **Delayed post ischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats.** Pediatr Res; 51: 354-60.
- WOOD, S. 1995. **Oxygen as a modulator of body temperature.** Braz. J. Med. Biol.Res. 28:1249-56
- WOOD, S. 1991. **Interactions between hypoxia and hypothermia.** Annu Rev Physiol 53:71-85.
- YENARI, M., KITAGAWA, K. 2008. **Metabolic Downregulation .A Key to Successful Neuroproteccion?** Stroke. 39:2910-2917
- ZHOU, F., BRADDOCK, J., HU, Y., ZHU, X. 2001. **Microbial origin of glutamate, hibernation and tissue trauma: an in vivo microdialys study.** J. Neurosci. Meth. 119, 121-128