



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“CUANTIFICACIÓN DE GALECTINA-3 Y CITOCINAS EN ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS TRATADAS CON MELATONINA”

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q.F.B. Diana Garduño Rios.

Directora de Tesis:

D. C Bertha Fenton Navarro.

Coodirector de Tesis:

D.C. José Miguel Cervantes Alfaro.



Morelia, Michoacán.

Mayo, 2013

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Glicobiología y Neurociencias de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del IMSS.

Parcialmente apoyado por:
UMSNH/CIC 16.2-2011, 16.2-2012

Comité Tutorial:

D.C. Luz Torner Aguilar.

D.C. Graciela Letechipía Vallejo.

D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos.

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy y por haber permitido llegar al final de esta gran experiencia que ha sido estudiar una maestría.

Agradecer hoy y siempre a mi familia por el apoyo en mis estudios, de no ser así no hubiese sido posible. En especial a mis padres por todo el amor, sacrificio y confianza y por estar ahí siempre que los he necesitado.

A mi Directora de Tesis Doctora Bertha Fenton Navarro por creer en mí, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección, así como por su apoyo, confianza, amistad y por sus valiosos consejos.

Al Dr. Jose Miguel Cervantes por su apoyo en la realización de éste trabajo y por sus orientaciones y aportaciones al mismo.

A mi comité tutorial, por guiarme y ayudarme en el transcurso de estos dos años contribuyendo a mi formación como investigadora.

Al centro de investigación biomédica de Michoacán (IMSS) por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, en especial a la Doctora Luz Torner, por la oportunidad de ser parte de su laboratorio algunos meses, y compartir conmigo sus conocimientos, así como por su amistad, apoyo y confianza.

A mis compañeros de maestría, con los cuales compartí grandes momentos Meche, Rubén, Cesar, Araceli y José Luis, sin olvidar a mis compañeros de laboratorio y del CIBIMI, de muchos de los cuales no solo me llevo su apoyo sino algo más preciado su amistad.

ÍNDICE GENERAL

	pp.
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Enfermedad Cerebrovascular.....	1
1.2 Isquemia Cerebral Global.....	2
1.3 Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	3
1.4 Inflamación en isquemia cerebral.....	5
1.5 Células inflamatorias	
1.5.1 Leucocitos.....	6
1.5.2 Microglía.....	7
1.5.3 Astrocitos.....	8
1.6 Mediadores inflamatorios	
1.6.1 Metaloproteinasas.....	9
1.6.2 Óxido nítrico (NO) y Óxido nítrico sintasa inducible (NOS-i)....	9
1.6.3 Ciclooxigenasa-2.....	10
1.6.4 Quimiocinas y moléculas de adhesión.....	10
1.6.5 Citocinas en inflamación.....	11
1.6.5.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa.....	13
1.6.5.2 Interleucina-6.....	14
1.6.5.3 Interleucina-10.....	15
1.7 Lectinas.....	16
1.7.1 Galectinas.....	16
1.7.1.1 Galectina-3 en isquemia cerebral.....	18
1.8 Neuroprotección y Melatonina.....	19
1.9 Modelos de evaluación del daño.....	23
II. JUSTIFICACIÓN.....	25
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVO GENERAL.....	27
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27

VI. MATERIAL.....	28
VII. MÉTODOS	
7.1 Modelo experimental de isquemia cerebral global.....	28
7.2 Grupos y tratamiento.....	29
7.3 Cuantificación de Citocinas y Galectina-3 circulantes.....	30
7.4 Prueba de Campo abierto.....	31
7.5 Análisis estadístico.....	31
VIII. RESULTADOS.....	32
IX. DISCUSIÓN.....	41
X. CONCLUSIONES.....	48
XI. PERSPECTIVAS.....	49
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	pp.
1. Concentración sérica de TNF- α	33
2. Concentración sérica de IL-6.....	34
3. Concentración sérica de IL-10.....	35
4. Concentración sérica de Gal-3.....	37
5. No. total de cruces.....	38
6. Porcentaje No. de cruces centro.....	39
7. Tiempo centro.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	pp.
1. Principales estudios publicados en la expresión de interleucinas en modelos de isquemia cerebral Global.....	12

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosín trifosfato
BHE: Barrera hematoencefálica
Ca⁺⁺: Calcio
COX-1: Ciclooxygenasa-1
COX-2: Ciclooxygenasa-2
CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
ECV: Enfermedad Cerebrovascular
ELISA: Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas
ERNs: Especies reactivas de nitrógeno
EROs: Especies reactivas de oxígeno
GFAP: Proteína acida glial fibrilar
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HIF: Factor inducible por hipoxia
I/R: Isquemia/Reperusión
ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular 1
ICG: Isquemia Cerebral Global
ICGA: Isquemia Cerebral Global Aguda
IL: Interleucinas
JAK: Janus quinasas
MAPK: Quinasa de las proteínas activadas por mitógenos.
MCAO: Oclusión de la Arteria cerebral media
MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos
MIP-1: Proteína inflamatoria de macrófagos 1
MMPS: Metaloproteinasas
MPO: Mieloperoxidasa
Na⁺: Sodio
NFkB: Factor nuclear kappa B
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa
NOS-e: Óxido nítrico sintasa endotelial
NOS-i: Óxido nítrico sintasa inducible
NOS-n: Óxido nítrico sintasa neuronal
Nrf2: Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2
 O_2^- : Anión radical superóxido
 O_2 : Oxígeno
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻: Peroxinitrito
PI-3: Fosfatidil inositol-3
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
SNC: Sistema Nervioso Central
STAT: Transmisoras de señales y activadoras de la transcripción.
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
4VO: Oclusión de los 4 vasos

RESUMEN

Entre los mecanismos de daño celular isquémico, la respuesta inflamatoria inducida por Isquemia Cerebral Global Aguda (ICGA) desempeña un papel crucial en los mecanismos de daño cerebral, las citocinas y Galectina-3 (Gal-3) pueden estar relacionadas en éste proceso. No existen reportes de variaciones de éstas proteínas en tiempos inmediatos después de isquemia/reperfusión (I/R), por lo que en éste trabajo se planteó el análisis de concentraciones séricas de TNF- α , IL-6, IL-10 y Gal-3 (ELISA), antes (0) y a 30 minutos, 6 h y 24 h después de I/R, en ratas macho adultas utilizando estuches comerciales. Se empleó la inducción de ICGA por oclusión de los cuatro vasos, seguido por 6 h de infusión de melatonina iv o vehículo. Dos grupos de animales control Sham-melatonina y Sham-vehículo fueron incluidos en el estudio. También se analizó la actividad locomotora (prueba de Campo Abierto), a las 24 h. **Resultados:** La ICGA seguida por reperfusión indujo una disminución en las concentraciones séricas de TNF- α , y un incremento de IL-6 a las 24h pos isquemia, en tanto que melatonina provocó una reducción significativa de las concentraciones séricas de las citocinas a las 6 h (TNF- α) y 24 h (IL-6) luego de I/R. En condiciones de ICGA las concentraciones séricas de TNF- α , IL-6, IL-10 pueden reflejar la magnitud y curso temporal del proceso inflamatorio involucrado en el daño cerebral inducido por la isquemia, los cambios observados se deben al tratamiento neuroprotector con melatonina. Las concentraciones circulantes de Gal-3 se redujeron a partir de los 30 min de I/R lo que podría estar relacionado con el incremento de especies reactivas de oxígeno. El tratamiento neuroprotector con melatonina así como la isquemia provocaron una reducción de las concentraciones séricas de Gal-3 a las 6h. Los resultados de la prueba de campo abierto mostraron menor daño cerebral del hipocampo y menor estado de ansiedad en los animales isquémicos tratados con melatonina en comparación con los animales isquémicos tratados con vehículo.

La presente investigación constituye el primer reporte en el que se evalúan variaciones de concentraciones circulantes de citocinas y Gal-3 en tiempos inmediatos seguidos de AGCI. Esto contribuye a explicar los mecanismos de daño cerebral que podrán ser utilizados en tratamientos médicos. Los neuroprotectores como la melatonina, producen cambios en éstas moléculas que reducen el daño cerebral, reducen la ansiedad y mejoran la locomoción.

Palabras Clave: Isquemia Cerebral Global, Inflamación, Melatonina, Ratas.

ABSTRACT

In the Acute Global Cerebral Ischemia (AGCI), the inflammatory response plays a crucial role in brain damage. Cytokines as well as Galectin-3 (Gal-3) may be related to brain damage after ischemia. In AGCI there are no reports circulating levels variations in a time frame around this event, so in this study circulating concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10, and Gal-3 were quantified using commercial ELISA kits in adult male rats. Samples were taken at the following times: before (0), 30 min, 6 h and 24 h subsequent to I/R. The four-vessel occlusion method was used, followed by 6 h iv infusion of melatonin or vehicle. Also the locomotion activity (open field test) was evaluated after 24h. Two groups of control animals "Sham" (Sham-melatonin and sham-vehicle) were also included in the study. **Results:** AGCI followed by reperfusion induced a decrease in serum concentrations of TNF- α , and an increase in IL-6 at 24 h after ischemia, whereas than melatonin caused a significant reduction in serum concentrations of the cytokines at 6 h (TNF- α) and 24 h (IL-6) after I/R. In AGCI conditions the in serum concentrations TNF- α , IL-6, IL-10 may reflect the magnitude and time course of the inflammatory process involved in the brain damage induced by ischemia and changes attributable to the neuroprotective treatment with melatonin. Circulating levels of Gal-3 was reduced from 30 min after I/R, which could be related to the increase of reactive oxygen species. Neuroprotective treatment with melatonin and ischemia caused a reduction of serum concentrations of Gal-3 at 6 h. The results of the open field test showed less damage in the hippocampus and less anxious state in ischemic animals treated with melatonin compared to ischemic animals treated with vehicle. **Conclusion:** This work represents the first study of the involvement of cytokines and Galectin-3 in immediate times following AGCI. This contributes to explain the mechanism of brain damage that can be used in medical treatments. Neuroprotectors such as melatonin, produces changes in these molecules that reduces brain damage this was also evident in anxiety and locomotion behavior studied.

Keywords: Galectin-3, Cytokines Global Cerebral Ischemia, Inflammation, Melatonin, Rats.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad Cerebrovascular

La enfermedad cerebrovascular (ECV) representa un importante problema de salud en México y el mundo. Se considera la segunda causa de muerte a nivel mundial solo después de la Cardiopatía isquémica (OMS, 2008). Además es la primera causa de invalidez (Sánchez, 2008). De acuerdo a publicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se producen 4,6 millones de muertes anuales en el mundo por esta causa, lo que equivale a 1 muerte cada 7 segundos (Sacco *et al*, 1999). Asimismo constituye un problema de salud; al aumentar los gastos en los servicios médicos, con un enorme impacto en la calidad de vida individual y familiar. Se estima que aproximadamente 20% de los sobrevivientes requieren cuidados especiales durante tres meses después del evento y casi 30% quedan con una discapacidad grave permanente (Sánchez, 2008). Aunque afecta a todos los estratos de la población, su aparición se incrementa con la edad (Fernandez-Gomez *et al*, 2008). En México la esperanza de vida ha aumentado y junto con ella la prevalencia de ECV (Sánchez, 2008). Es así, que en México la ECV ocupa el 6º lugar como causa de muerte entre la población general, 4º lugar entre el género femenino y el 7º en el masculino (INEGI, 2011).

La ECV se define como el desarrollo rápido de signos clínicos de disturbios de la función cerebral o global, con síntomas que persisten 24 horas o más, o que llevan a la muerte con ninguna otra causa evidente que el origen vascular (Hochmann *et al*, 2006), por su naturaleza, se puede dividir en dos: isquémica y hemorrágica. Con una proporción del 85% para la isquémica frente a un 15% de la hemorrágica (Diez-Tejedor *et al*, 2001). La *isquemia cerebral*, es causada por insuficiencias importantes en el flujo sanguíneo cerebral. Cuando se impide totalmente el aporte sanguíneo al cerebro, por ejemplo, como consecuencia de una parada cardíaca, se define como isquemia cerebral global (Arribas-Prieto *et al*, 2008). Cuando la reducción del flujo sanguíneo se produce en un área cerebral limitada, irrigada por una determinada arteria cerebral, se define como isquemia cerebral focal (Diez-Tejedor *et al*, 2001). En cambio, la

Hemorragia Cerebral se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo que libera sangre dentro del parénquima cerebral, produciendo daño (Pradillo, 2008).

1.2 Isquemia Cerebral Global

El cerebro depende críticamente de un suministro continuo de oxígeno y glucosa, más que cualquier otro órgano (Magistretti y Pellerin, 1999). Mientras que el cerebro en el hombre representa sólo el 2% de su peso corporal total, sin embargo recibe el 15% del gasto cardíaco y consume el 20% del oxígeno (O₂) total (Cheung, 2003), a una velocidad aproximada de 3,5 mol O₂/100 gr tejido cerebral por minuto (Basco *et al*, 2011); para mantener este ritmo necesita un flujo sanguíneo que en promedio es de 50 a 60 ml/100 gr de cerebro/minuto (Cheung, 2003). Este oxígeno y la alta demanda de energía se utiliza para mantener las funciones electrofisiológicas; es decir para el mantenimiento activo de sus gradientes iónicos, para la síntesis, el transporte eficiente, la recaptación de los neurotransmisores y la integridad del citoesqueleto (Hossmann, 1994; Cheung, 2003).

Se habla de Isquemia Cerebral Global (ICG) cuando se da una disminución transitoria en el flujo sanguíneo cerebral en todo el cerebro (Diez-Tejedor *et al*, 2001), se espera daño cerebral cuando el flujo sanguíneo cerebral se reduce hasta valores inferiores a menos de 10-20% del valor normal (Cervantes *et al*, 2012). La irrigación deficiente del cerebro causa rápidamente alteraciones en el metabolismo celular y dependiendo de la severidad y duración del proceso isquémico puede llegar a presentarse daño celular irreversible que se manifiesta principalmente por muerte neuronal (Harukuni y Bhardwaj, 2006).

La ICG ocurre comúnmente en pacientes con una variedad de condiciones clínicas incluidas paro cardíaco, Shock, asfixia y en pacientes que han experimentado una compleja cirugía cardíaca (Harukuni y Bhardwaj, 2006), siendo el paro cardíaco la principal causa en humanos para que esta se presente (Cervantes *et al*, 2012).

La ICG produce daño neuronal heterogéneo al cerebro (Wijdicks *et al*, 2001), así neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral, neuronas espinosas del núcleo caudado y las células de Purkinje del cerebelo son las neuronas más

vulnerables a periodos cortos de isquemia (Cervantes *et al*, 2012; Harukuni y Bhardwaj, 2006). Este daño provocado por la isquemia induce a su vez deterioro en aquellas funciones cerebrales cuya integración depende de las estructuras lesionadas (Cervantes *et al*, 2012; Gomez, 1991).

1.3 Fisiopatología de la Isquemia Cerebral

La interrupción de la circulación durante 10s provoca una pérdida de conocimiento por falta del suministro de oxígeno al cerebro. A los 2-4 min hay pérdida de los depósitos cerebrales de glucosa y glucógeno, y a los 4-5 min se agota el adenosín trifosfato (ATP) (Tormo-Calandín, 2004). Con la pérdida en la producción de ATP varios mecanismos de daño neuronal se activan y se desarrollan tanto en cascada como en vías paralelas (Cervantes *et al*, 2012), tales mecanismos incluyen: Alteración del flujo transmembranal de iones, excitotoxicidad, estrés oxidativo, inflamación (se tratara con más detalle en el siguiente apartado) y señalización intracelular pro apoptótica (Cervantes *et al*, 2012; Geocadin *et al*, 2008; Harukuni y Bhardwaj, 2006).

a) Alteración del flujo transmembranal de iones

Con el inicio de la isquemia las neuronas son incapaces de mantener los gradientes iónicos, y la despolarización generalizada se produce, los iones dependientes de la bomba ATP, como el sodio (Na^+) y el potasio, son incapaces de mantener la homeostasis iónica (Fernandez-Gomez *et al.*, 2008). En consecuencia, ingresan a las células grandes cantidades de Na^+ con la consiguiente despolarización membranal (despolarización anóxica), el ingreso de Calcio (Ca^{++}) a través de canales dependientes de voltaje y la liberación de neurotransmisores incluyendo a los aminoácidos excitatorios glutamato y aspartato (Kogure *et al*, 1988).

b) Excitotoxicidad y acumulación de Calcio

Como resultado de la despolarización anóxica, el glutamato y aspartato son liberados activando los canales dependientes de ligando de calcio y sodio con un nuevo influxo de éstos iones a la célula (Cervantes *et al*, 2012) lo que provoca una lesión excitotóxica (Harukuni y Bhardwaj, 2006) que está mediada en gran parte a través de receptores NMDA. La activación de los receptores de NMDA por glutamato conduce a un influxo de calcio hacia el espacio intracelular. Esta elevación de Calcio intracelular, activa una serie de segundos mensajeros, que amplifican la lesión por permeabilidad aumentando aún más la concentración de dicha molécula y la liberación de glutamato (Geocadin *et al*, 2008). Calcio intracelular elevado, causa la activación de fosfolipasas Ca^{++} dependiente, proteasas, y endonucleasas conduciendo a daño de proteínas estructurales, funcionales y un daño al citoesqueleto y a macromoléculas incluyendo ácidos nucleicos, también aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno por interferir con la cadena respiratoria mitocondrial (Cervantes *et al*, 2012; Geocadin *et al*, 2008).

c) Estrés oxidativo

Estrés oxidativo en el cerebro ocurre cuando la generación de EROs excede la habilidad de los sistemas endógenos antioxidantes de remover EROs llevando a daño celular (Esposito y Cuzzocrea, 2010). Las EROs que son particularmente responsables del estrés oxidativo incluyen el óxido nítrico (NO), anión radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo libre (Nakka *et al*, 2008). Las EROs son especies químicas con un gran poder oxidativo porque tienen un solo electrón en la órbita externa. En este estado, el radical es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas causando daño a través de peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y fragmentación de ADN, todos ellos contribuyen a muerte celular (Geocadin *et al*, 2008; Mitchell *et al*, 2007; Nakka *et al*, 2008). Además, EROs también pueden activar muchos factores de transcripción; particularmente, el factor nuclear kappa B (NFkB), que participa en la regulación de genes que son importantes en la

inflamación, la inmunidad innata, el crecimiento y la muerte celular (Mauriz *et al*, 2013; Nakka *et al*, 2008).

d) Señalización intracelular pro apoptótica

Los tipos de muerte celular descritos en la isquemia cerebral son dos: necrosis y apoptosis. La apoptosis puede ser responsable de más del 50% de la muerte celular en isquemia y trauma y tanto señales extra- como intra-celulares capaces de iniciar este proceso han sido identificadas luego de la isquemia (Letechipia-Vallejo *et al*, 2004). Muerte celular por apoptosis involucra condensación y fragmentación de la cromatina, formación de vesículas y fragmentación celular en cuerpos apoptóticos. Disfunción mitocondrial origina las señales intracelulares para apoptosis mientras que las señales extracelulares involucran la activación de la familia de receptores TNF (Mitchell *et al*, 2007). La cascada pro-apoptótica implica al NFκB y vías P53-dependientes, los cambios en la relación Bcl-2/Bax, la apertura del poro de transición mitocondrial, la liberación de citocromo c, y la activación de las caspasas (Cervantes *et al*, 2012).

1.4 Inflamación en Isquemia Cerebral

Casi cualquier tipo de daño tisular activa inflamación, sin embargo, la respuesta inflamatoria varía con la naturaleza de la lesión (mecánica, química, infecciosa y tumoral) y con el tejido. Si bien por muchos años, el Sistema Nervioso Central (SNC) fue considerado un órgano “privilegiado” del sistema inmune (Jacobs *et al*, 2012), debido a diferentes características locales como la presencia de una barrera hematoencefálica y la ausencia de drenaje linfático convencional (González y Toro, 2007), esta definición ha evolucionado en los últimos años y ahora se reconoce que el sistema nervioso e inmune mantienen una interacción directa y dinámica (Jacobs *et al*, 2012). Los procesos inflamatorios en el cerebro, se saben que están asociados con graves afecciones neurodegenerativas por ejemplo, daño cerebral isquémico (Zhu *et al*, 2006). Todas las células en el cerebro participan en estas respuestas inflamatorias, incluyendo la microglía, los

macrófagos, astrocitos, neuronas y oligodendrocitos (Farooqui, 2011). Neuroinflamación comienza como un mecanismo de defensa del huésped asociada con la neutralización del insulto y restauración de la estructura y la función normal (Rosi, 2011).

Un ambiente inflamatorio después de la lesión cerebral se ha demostrado para promover la plasticidad y la recuperación funcional (Johansson y Grabowski, 1994; Kawamata *et al*, 1997). Está bien establecido que la inflamación juega un papel positivo en la neurogénesis durante la isquemia (Whitney *et al*, 2009). En efecto, microglía activada, luego de un proceso isquémico, se ha propuesto para ser beneficioso por varios mecanismos incluyendo la captación de glutamato, eliminación de restos de células y la producción de factores neurotróficos (Madinier *et al*, 2009). Sin embargo, en contraste con este papel beneficioso, la respuesta inflamatoria inducida por isquemia y reperfusión en el cerebro, puede exacerbar los niveles iniciales de la lesión tisular (Lee *et al*, 2000). Hay varios posibles mecanismos por los cuales la inflamación post-isquémica contribuye a la lesión, incluida la obstrucción microvascular por los neutrófilos o la producción de mediadores tóxicos (citocinas, metaloproteinasas, EROs tales como óxido nítrico (NO)), por las células inflamatorias activadas (Chu *et al*, 2012; Lee *et al*, 2000).

1.5 Células inflamatorias

1.5.1 Leucocitos

Leucocitos representan uno de los mecanismos efectores más importantes de procesos inflamatorios (Price *et al*, 2003). Bajo condiciones patológicas, como isquemia cerebral, leucocitos ingresan dentro del parénquima cerebral desde la periferia (Brait *et al*, 2012; Minami *et al*, 2006). Normalmente estas células inmunes periféricas no tienen acceso dentro del SNC por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) intacta, sin embargo en un cerebro inflamado esta barrera está rota (Chakraborty *et al*, 2010). La población de leucocitos consiste de neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos, donde cada uno puede contribuir a la inflamación luego de isquemia (Brait *et al*, 2012; Minami *et al*, 2006). Su reclutamiento es inducido por quimiocinas y por la

sobrerregulación de moléculas de adhesión endotelial que están implicadas en la adhesión vascular y la migración transendotelial a través de la BHE abierta (Sekeljic *et al*, 2012), con la consecuente liberación de moléculas potencialmente tóxicas para las neuronas tales como; EROs y citocinas (Brait *et al*, 2012; Denes *et al*, 2010). Posteriormente, estas células dañadas liberan más mediadores tóxicos, que a su vez activan más células inmunes. Por lo tanto, la inflamación prolongada causada por este círculo vicioso exacerba el daño cerebral (Chu *et al*, 2012). La presencia de leucocitos en vasos cerebrales ha sido observada tempranamente luego de ambos isquemia focal e isquemia global (Schleien y Kuluz, 1996). Dietrich *et al*, demostró acumulación de leucocitos a 1 hora de resucitación luego de 20 minutos de isquemia global (Dietrich *et al*, 1984) en ratas. Leucocitos son mediadores importantes de la lesión vascular y del parénquima fuera del SNC a través de la liberación de enzimas hidrolíticas, mediadores derivados de lípidos, mediadores vasogénicos, o la producción de radicales de oxígeno (Kochanek y Hallenbeck, 1992). Micro-infartos en áreas de interrupción endotelial y vesículas de membrana endoteliales en la presencia de leucocitos puede reflejar un fenómeno de no reflujo en estas áreas (Schleien y Kuluz, 1996). El fenómeno de no reflujo, se refiere a la inhabilidad de restablecer el flujo sanguíneo en pequeñas regiones a lo largo del cerebro luego de isquemia a pesar de lograr la presión de perfusión cerebral adecuada (Ames *et al*, 1968; Schleien y Kuluz, 1996). Fenómeno de no reflujo ha sido observado luego de isquemia focal y global (Schleien y Kuluz, 1996).

1.5.2 Microglía

Estas células son las células inmunes residentes del SNC, pertenecen al linaje fagocítico mononuclear, y son los mediadores primarios de la respuesta inmune innata del cerebro (Loane y Byrnes, 2010). En el cerebro sano, microglía habitualmente interactúa con elementos neuronales y no neuronales, tanto estructural como funcionalmente. Llevando a cabo funciones tales como: fagocitosis de las estructuras sinápticas durante el desarrollo postnatal, fagocitosis de neuronas durante la neurogénesis adulta, remodelación activa del medio ambiente peri-sináptico y liberación de factores en el cerebro maduro

y el envejecimiento (Tremblay *et al*, 2011). Sin embargo, en respuesta a lesiones cerebrales las células microgliales responden rápidamente con una secuencia compleja de eventos, que implica el cambio de su fenotipo (Czeh *et al*, 2011), proliferación, migración al sitio de daño y secreción de una variedad de agentes citotóxicos que son importantes mediadores de la lesión neuronal, tales como citocinas, EROs, proteasas y glutamato, y completamente activadas pueden convertirse en macrófagos cerebrales y ser indistinguibles de los macrófagos circulantes (Graeber *et al*, 1988; Kato, 2001; Morioka *et al*, 1991). Activación microglial comienza en unos pocos minutos después de la isquemia (Gehrmann *et al*, 1995). Se ha reportado su activación a solo 20 minutos de ICG/Reperusión, en hilus dentado y en el área CA1 del hipocampo (Morioka *et al*, 1991). Diversos estudios enfocados en reducir la activación microglial, han demostrado reducir los daños neuronales después del tratamiento (Kusum y Thomas, 1997; Yrjänheikki *et al*, 1998). Por el contrario, otros han demostrado que la microglía en realidad puede desempeñar un papel protector después de la isquemia (Hirko *et al*, 2008; Lalancette-Hébert *et al*, 2007).

1.5.3 Astrocitos

Los astrocitos son el tipo predominante de células gliales en el cerebro y son esenciales para la supervivencia neuronal y la función sináptica, así como para la neurogénesis y la reparación neural (Osada *et al*, 2010). Sin embargo, los astrocitos desempeñan un papel importante en el daño del tejido cerebral. Astrocitos activados, presentan cambios morfológicos y bioquímicos, incluyendo un aumento del diámetro nuclear, la acumulación de filamentos intermedios, síntesis de proteína acida glial fibrilar (GFAP) y la glutamina sintetasa (Chen *et al*, 1992). Activación astrocítica también desencadena la producción de mediadores inflamatorios y moléculas citotóxicas tales como EROs, NOS, proteasas, etc (Nowicka *et al*, 2008). La activación de astrocitos se ha observado tanto en modelos de isquemia focal como en global y se ha postulado que astrocitos reactivos regulan tanto moléculas citotóxicas, como benéficas, que promueven el crecimiento luego de isquemia (Stoll *et al*, 1998).

1.6 Mediadores inflamatorios

1.6.1 Metaloproteinasas (MMPS)

MMPs comprenden una importante familia de proteasas asociadas con la membrana basal y el remodelamiento de la matriz extracelular y están involucrados en los procesos del SNC tanto fisiológicos como patológicos (Lee *et al*, 2004). En condiciones patológicas como ocurre en isquemia, MMPs son responsables de la ruptura de la matriz extracelular y de la barrera hematoencefálica (BHE) (Zalewska *et al*, 2002). En particular, las MMP-2 y MMP-9 se han implicado en la isquemia cerebral. Incremento significativo de MMP-9 ha sido reportado a las 6 horas posteriores a ICG en el hipocampo, mientras que MMP-2 se incrementa hasta las 72 horas (Lee *et al*, 2004).

1.6.2 Óxido nítrico (NO) y Óxido nítrico sintasa inducible (NOS-i)

NO es una molécula en el SNC, con funciones como un neurotransmisor, así como un regulador del flujo sanguíneo cerebral (Iadecola, 1997). NO es generado a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS), y puede tener tanto funciones neuroprotectoras como neurotóxicas en el cerebro isquémico. Tres formas de la enzima NOS han sido clonadas (NOS-e, NOS-n, NOS-i). En el cerebro isquémico se ha observado que la NOS endotelial (NOS-e) expresada en células endoteliales, genera NO con efectos benéficos, mientras que el NO generado por la forma NOS inducible (NOS-i) contribuye a la neuroinflamación y neurodegeneración (Mun *et al*, 2010). Los mecanismos por los cuales el NO y sus derivados (fundamentalmente el ONOO⁻) ejercen sus efectos nocivos son diversos, incluyendo desde la inhibición de las enzimas que sintetizan ATP, daño del ADN, y daños por oxidación en diferentes componentes de la membrana (Yamashita *et al*, 2000). La elevación de NOS-i en la glía activada se ha reportado en ICG dentro de 1-3 días luego de 10 minutos de ICG (Lipton *et al*, 1999).

1.6.3 Ciclooxygenasa-2 (COX-2)

La ciclooxygenasa es una proteína integral de membrana, encargada de la síntesis enzimática de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (Vane y Botting, 1998). Dos formas de la enzima ciclooxygenasa han sido clonadas. La ciclooxygenasa-1 (COX-1) se expresa constitutivamente en muchos tejidos incluyendo plaquetas, mucosa gastrointestinal, y riñón, mientras que la forma inducible de la ciclooxygenasa-2 (COX-2), se expresa sobre todo en los leucocitos y el cerebro. Su expresión es inducida por citocinas, excitación neuronal y aumento de Ca^{++} intracelular, estímulos que también son importantes en la fisiopatología de la muerte neuronal en la isquemia y una variedad de enfermedades neurodegenerativas (Nakayama *et al*, 1998), es así que COX-2 está sobre expresada después de ICG y, se ha reportado que su inhibición reduce el daño (Lipton *et al*, 1999; Nakayama *et al*, 1998). La COX-2, activa el metabolismo de prostaglandinas y por lo tanto conduce a la generación de EROs, ERNs y diferentes prostanoides (Nogawa *et al*, 1997) causantes del daño celular.

1.6.4 Quimiocinas y moléculas de adhesión

Quimiocinas son proteínas que participan en la comunicación celular y reclutamiento durante la inflamación. Normalmente quimiocinas y sus receptores son expresados en muy bajas concentraciones (Bacon y Harrison, 2000). Sin embargo, estas son sobre expresadas luego de isquemia y median el tráfico de leucocitos sobre el endotelio cerebral inflamado (Chen *et al*, 2003). Algunas quimiocinas que han sido relacionadas con el daño Isquemia/Reperusión (I/R) son: proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), Interleucina-8 (IL-8) y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1) (Romano, 2011). Su inhibición o deficiencia se ha asociado a un menor daño (Garau *et al*, 2005). Después de ICG, existe un incremento en MCP-1 (Yoshimoto *et al*, 1997).

Rodamiento y adhesión de leucocitos sobre el endotelio es mediada por moléculas de adhesión (Granger y Kubes, 1994), estas incluyen: molécula de

adhesión intracelular 1 (ICAM-1), selectinas-E (endotelial),-P (plaquetas) y -L (leucocitos), fibronectina, laminina y las integrinas (Lipton *et al*, 1999). La expresión de Selectina-E y P así como de ICAM-1 es incrementada luego de ICG (Lehmberg *et at*, 2006; Yoshimoto *et al*, 1997).

1.6.5 Citocinas en inflamación

Con el término de citocinas se engloban más de 100 péptidos genética y estructuralmente diferentes, secretados por las células inmunocompetentes, de bajo peso molecular (normalmente menos de 30 Kd) que actúan uniéndose a receptores específicos sobre la superficie celular, estas han sido identificadas como mediadores esenciales en la respuesta inflamatoria (Minami *et al*, 2006). Citocinas participan en muchas funciones normales del SNC por ejemplo participan en la regulación del sueño, en funciones neuroendocrinas, además desempeñan un papel importante en el desarrollo y posiblemente en el envejecimiento normal (Galic *et al*, 2012).

ICG activa la microglía y astrocitos, y sobre regula la producción de citocinas inflamatorias. Células de la microglía activadas y astrocitos tienen un importante papel en la progresión del daño isquémico por la producción de citocinas (Yasuda *et al*, 2011). Las principales citocinas que actúan en los procesos de inflamación son: las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), todas ellas proinflamatorias. Dentro de las citocinas antiinflamatorias se encuentra la IL-10 (Zhu *et al*, 2006). La activación y secreción de citocinas inflamatorias, induce expresión COX-2 y NOS-i que lleva a la generación de radicales libres (Mun *et al*, 2010), además pueden actuar como atrayentes químicos de leucocitos (Cervantes *et al*, 2012) y regular la expresión de MMPs y moléculas de adhesión en las células endoteliales, promoviendo el paso de células inflamatorias periféricas (Denes *et al*, 2010). Así también, participan en la señalización pro-apoptótica ya que TNF- α es un potente activador de la apoptosis a través del receptor TNF-1 que es incrementado luego de isquemia (Lipton *et al*, 1999).

En 1992, fue reportada la inducción de mRNA de IL-1 posterior a ICG, usando el modelo de oclusión de los 4 vasos (4VO) (Minami *et al*, 2006). Este fue el

primer reporte que mostró la inducción en la expresión genética de citocinas después de isquemia cerebral y ha sido seguido por un numeroso número de estudios que reportan citocinas en el cerebro generadas por la isquemia (Tabla 1).

Tabla 1. Principales estudios publicados en la expresión de interleucinas en modelos de Isquemia cerebral Global

Citocina	Modelo	Referencias	Método	Resultados
IL-1 β	4VO (rata)	Minami <i>et al</i> , 1992.	RT-PCR	\uparrow RNAm A los 15 min en el hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado y tálamo. Con 2 picos a los 30 y 240 min.
IL-1	4VO (rata)	Yasuda <i>et al</i> , 2011.	Inmunoensayo	\uparrow Proteína en el hipocampo, al día 1, 2, 3, 5, 10, 14 y 21.
IL-1 β	2VO (ratón)	Zhu <i>et al</i> , 2006.	RT-PCR	\uparrow RNAm en el hipocampo, 1 pico a las 12 h.
IL-1 α e IL-1 β	4VO (rata)	Yoshimoto <i>et al</i> , 1997.	RT-PCR	\uparrow RNAm en homogenado de cerebro a 1h disminuyendo a las 24 h.
TNF- α	BCCO (gerbo)	Saito <i>et al</i> , 1996.	ELISA <i>in situ</i>	\uparrow RNAm en el hipocampo y estriado a 1 h, disminuyo a nivel control y aumento de nuevo a las 24 h.
	4VO (rata)	Yasuda <i>et al</i> , 2011.	Inmunoensayo	\uparrow Proteína en el hipocampo, al día 10, 14 y 21.
	BCCO (ratón)	Zhu <i>et al</i> , 2006.	RT-PCR	\uparrow RNAm en el hipocampo, 2 picos a las 3 y 24 h.
	4VO (rata)	Yoshimoto <i>et al</i> , 1997.	RT-PCR	\uparrow RNAm en homogenado de cerebro a 1h disminuyendo a las 24 h.
IL-6	BCCO (gerbo)	Saito <i>et al</i> , 1996.	ELISA	\uparrow RNAm 3–96 h (bifásica) en el hipocampo.
	4VO (rata)	Yasuda <i>et al</i> , 2011.	Inmunoensayo	\uparrow Proteína en el hipocampo, al 1, 2, 3, 10, 14, 21 días.
	BCCO (gerbo) 2VO (ratón)	Suzuki <i>et al</i> , 1999. Zhu <i>et al</i> , 2006.	IHC RT-PCR	\uparrow RNAm 3 h-7d (bifásica).
	4VO (rata)	Yoshimoto <i>et al</i> , 1997.	RT-PCR	\uparrow RNAm en el hipocampo, 2 picos a las 6 y 24 h. \uparrow RNAm en homogenado de cerebro hasta las 24 h.
IL-10	4VO (rata)	Yasuda <i>et al</i> , 2011.	Inmunoensayo	No hubo diferencia significativa entre el grupo 4VO y SHAM.
TGF- β	4VO (rata)	Wiessner <i>et al</i> , 1993.	Hibridación <i>in situ</i>	\uparrow RNAm a los 3 días en el hipocampo, en la corteza, cuerpo estriado y tálamo. A los 7 días se observó en el sector CA1 del hipocampo.

Oclusión bilateral de las carótidas comunes (BCCO), oclusión de los cuatro vasos (4VO) y Oclusión de 2 vasos (2VO) son los modelos de isquemia global respectivamente. \uparrow : Incremento. Inmunoensayo absorbente ligado a enzimas (ELISA), Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) son algunos de los métodos utilizados para la detección de citocinas. Fuente: Modificado de Minani *et al*, 2006 y Suzuki *et al*, 2009.

Un incremento en citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α ha sido reportado en tiempos tempranos después de ICG transitoria (Minami *et al*, 2006). En la mayoría de estos estudios la producción de citocinas ha sido medida a través de los niveles de mRNA, sin embargo, se ha postulado que el

mRNA recién sintetizado no siempre es transcrito para producir la proteína, por cual es más conveniente medir los cambios en los niveles de la proteína para una exacta comprensión de la función de la citocina (Yasuda *et al*, 2011).

1.6.5.1 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α es una citocina pleiotrópica con efectos neurotóxicos y neuroprotectores (Maddahiet *al*, 2011), es sintetizado como un polipéptido precursor unido a la membrana (26 kDa) y constituye el principal mediador de inflamación (Cuenca *et al*, 2010). Ejerce sus efectos biológicos vía interacción con dos receptores R1 (p55) y R2 (p75) (Shohami *et al*, 1999). Esta citocina proinflamatoria se produce en estimulación por los monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos y mastocitos (Anaya, 2003). En el SNC, esta citocina se expresa predominantemente por la microglía activada, y en menor medida, por los astrocitos y neuronas (Whitney *et al*, 2009). TNF- α activa la vía del NF κ B estimulando la producción de citocinas pro-inflamatorias, participa en la señalización de muerte celular (apoptosis), así como la supervivencia celular (Sriram y O'Callaghan, 2007), además esta citocina está implicada en las alteraciones de la barrera hematoencefálica, en la transformación de las superficie de las células endoteliales es proadhesiva-procoagulante, en la activación de las células gliales (Pantoni *et al*, 1998), y cambios vasculares asociados con daño al cerebro (Maddahi *et al*, 2011).

El TNF- α está sobre regulado en el cerebro después de un proceso isquémico. En la isquemia cortical en ratas, aparece una inducción del ARNm de TNF- α después de una oclusión de la ACM permanente (Liu *et al*, 1994) o transitoria (Wang *et al*, 1994). Mientras que en modelos de ICG se observa un incremento en la expresión de ARNm en el hipocampo y estriado entre 1-3 horas después de la inducción de la isquemia cerebral (Saito *et al*, 1996; Zhu *et al*, 2006) y, posteriormente, vuelve a haber un segundo pico de expresión entre las 24 horas, mostrando por tanto una expresión en dos fases (Zhu *et al*, 2006). En un estudio hecho por Yasuda y colaboradores observaron niveles altos significativos del día 10 al 14 en el hipocampo (Yasuda *et al*, 2011).

1.6.5.2 Interleucina-6 (IL-6)

IL-6, primero identificada como factor estimulante de células B, es una glicoproteína con una masa molecular de 20 a 30 kDa (Loddick *et al*, 1998), une receptores de citocinas clase I, tales receptores son proteínas membranales con una arquitectura modular característica que no poseen actividad enzimática intrínseca, y que para la señalización frecuentemente necesitan el reclutamiento adicional de proteínas (gp130, βc y γc) compartidas por diferentes citocinas, pueden activar intracelularmente vías JAK/STAT, PI-3 (fosfatidil inositol-3)-quinasa y MAPK (Erta *et al*, 2012). La expresión cerebral se incrementa en una amplia variedad de trastornos del SNC, incluida isquemia (Loddick *et al*, 1998). Secretada por la microglía activada, astrocitos, neuronas y células invasoras del sistema inmune, su papel en la isquemia cerebral inducida por la inflamación es controvertido. Similares a TNF- α , IL-6 ha sido conocido por ser tanto perjudicial y beneficioso (Suzuki *et al*, 2009) después de lesiones isquémicas. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α (Cuenca *et al*, 2010). Esta citocina orquesta la respuesta inflamatoria entre las células sanguíneas, el endotelio vascular y las células residentes del parénquima cerebral y puede inducir la síntesis de algunas quimiocinas y moléculas de adhesión, junto con alteraciones en la barrera hematoencefálica puede provocar la infiltración de leucocitos (Suzuki *et al*, 2009). Diversos estudios sugieren que la IL-6 está sobre regulada después de la isquemia cerebral (Wang *et al*, 1994), habiéndose postulado que posee efectos perjudiciales en la isquemia cerebral. Por ello, los niveles plasmáticos de IL-6 parecen ser un buen indicador del deterioro neurológico temprano (Vila *et al*, 2000). La elevación en suero IL-6 se ha encontrado en pacientes con ictus agudo. El aumento de las concentraciones séricas de IL-6 comenzó a las 24 h, y alcanzó su punto máximo entre 2 y 4 días después del comienzo del accidente cerebrovascular. Niveles altos de IL-6 continuaron hasta 90 días después del accidente cerebrovascular (Suzuki *et al*, 2009). En ratas sujetas a Oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAOp), niveles de RNAm de IL-6 fue elevado a las 3h, observándose un pico a las 12h y permaneciendo elevadas hasta las 24h (Wang *et al*, 1995). En modelos de ICG también se ha

observado un incremento en la expresión a las pocas horas del evento isquémico, encontrando un pico a las 3 horas después de la isquemia (Saito *et al*, 1996) en el hipocampo y estriado. Mientras que Yasuda y Yoshimoto han reportado su incremento hasta las 24 horas (Yasuda *et al*, 2011; Yoshimoto *et al*, 1997)

1.6.5.3 Interleucina-10 (IL-10)

IL-10 es una citocina con potentes propiedades anti-inflamatorias (Zhang y An, 2007), es sintetizada principalmente por las células Th2 CD4⁺, monocitos, y células B y circula como un homodímero con masa molecular de 37 kDa, cada monómero consiste en dos proteínas estrechamente unidas de 160 aminoácidos y masa molecular de 18.5 kDa (Opal y De palo, 2000), la estimulación de los receptores de IL-10 regula numerosas vías de señalización incluyendo Jak1/Stat3, PI-3-quinasa, MAPK, SOCS, y NFkB (Strle *et al*, 2001), produciendo efectos tales como la inhibición de la producción de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1) (Zhang y An, 2007), regulación positiva de los antagonistas de citocinas inflamatorias (Ooboshi *et al*, 2005), así como la disminución en la expresión y actividad de receptores de citocinas llevando a una reducción en inflamación (Strle *et al*, 2001). Además IL-10 parece actuar como un agente antiapoptótico mediante el bloqueo de las acciones de la caspasa-3 (Arimoto *et al*, 2007).

IL-10 es liberada por la microglía activada y astrocitos en respuesta a isquemia cerebral (Yasuda *et al*, 2011). Se ha observado que disminuye la activación microglial en respuesta a la exposición a citocinas inflamatorias (Pestka *et al*, 2004) y en modelos de isquemia cerebral global se ha observado su expresión desde las 6 h en el hipocampo luego de isquemia, aunque esta expresión no difirió de los animales control (Yasuda *et al*, 2011). Inyección de IL-10 exógena luego de isquemia cerebral global incrementa la supervivencia de las neuronas del sector CA1 en el hipocampo en ratas (Dietrich *et al*, 1999), mientras que niveles bajos de IL-10 en plasma dentro de las 24 horas después del evento isquémico han sido asociadas a un deterioro neurológico temprano en pacientes con ACV isquémico (Vila *et al*, 2003).

1.7 Lectinas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que unen de manera específica y reversible a mono y oligosacáridos, no tienen actividad catalítica y en contraste con anticuerpos no son productos de una respuesta inmune (Sharon *et al*, 2004).

La ubicuidad de las lectinas refleja su participación decisiva en actividades celulares muy diversas. Operan en numerosos procesos intracelulares e intercelulares, lo mismo fisiológicos que patológicos. Ejemplos de los primeros son el reconocimiento de espermatozoide y óvulo durante la fecundación, adhesión entre células y célula-matriz extracelular en la embriogénesis y el desarrollo, diferenciación y proliferación celular, recambio de proteínas plasmáticas por el receptor hepático de asialoglicoproteínas y otros.

Son procesos patológicos donde intervienen lectinas la unión de bacterias, virus y toxinas a la superficie celular, inflamación, transformación maligna y metástasis, entre otros (Gallego *et al*, 2006).

Existe una larga lista de trabajos experimentales que demuestran la correlación entre el aumento de la expresión de lectinas intracelulares de la familia de las galectinas y el desarrollo de inflamación y cáncer en modelos animales, por lo que a continuación se describen a éste grupo de lectinas.

1.7.1 Galectinas

Son miembros de una familia altamente evolucionada y conservada (Gen ancestral de 0.8 billones de años) de lectinas animales distribuidos ampliamente en el reino animal (Rabinovich *et al*, 2002). Son capaces de descifrar glicocódigos específicos en macromoléculas complejas situadas en las membranas celulares o en la matriz extracelular (MEC) a través de un dominio de 135 aminoácidos filogenéticamente intacto desde invertebrados inferiores a mamíferos, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) (Rabinovich y Rubinstein, 2001). Esta familia de lectinas reconoce residuos de galactosidos.

Acorde con su estructura, han sido clasificadas en galectinas proto-tipo: incluyen galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11 y 13. Estas proteínas se comportan como homodímeros compuestos por dos CRD idénticos. Galectinas tipo-quimera: desempeñan su función a través de una interacción dual. El único miembro de esta familia, Galectina-3 (Gal-3). Galectinas con secuencias repetitivas: exhiben CRD estructuralmente distintos, que les confiere la propiedad de interaccionar con carbohidratos disímiles. Este grupo incluye las galectinas 4, 6, 8, 9 y 12 (Rabinovich *et al*, 2002).

Estas proteínas han sido involucradas en fenómenos de inmunomodulación, adhesión celular, regulación del crecimiento, inflamación, embriogénesis, reproducción, metástasis, proliferación y splicing. La ejecución de sus funciones varía en forma considerable de acuerdo a su localización subcelular, la regulación temporal y espacial de su expresión, y el estado de activación celular (Rabinovich y Rubinstein, 2001).

Se ha evaluado que la expresión de galectinas se modifica drásticamente en respuesta a agentes diferenciadores, productos de genes oncosupresores y oncogenes, agentes inflamatorios, activadores e infecciosos (Rabinovich y Rubinstein, 2001).

Galectina-3

Miembro de la familia de galectinas del tipo-quimera con una masa de 29 kD (Rabinovich *et al*, 2002), es sintetizada en el citoplasma como una proteína citosólica pero puede ser transportada a múltiples localizaciones subcelulares, en el núcleo celular, en la superficie celular o puede ser secretada fuera de las células (Yu, 2010) a través de un mecanismo no clásico llamado ectocitosis (Krześlak y Lipińska, 2004). Gal-3 es encontrada en solución como un monómero con dos dominios funcionales (Krześlak y Lipińska, 2004). Contacta con carbohidratos a través de su CDR situado en el dominio carboxi-terminal y con otros ligandos, como polipéptidos y polinucleótidos, a través de su dominio N-terminal (Rabinovich *et al*, 2001). Estructuralmente, Gal-3 posee un dominio N-terminal largo y flexible que consta de 100-150 residuos de aminoácidos compuestos de secuencias repetitivas de nueve residuos de aminoácidos ricos en prolina, glicina, tirosina y glutamina. El dominio N-terminal contiene sitios de

fosforilación (Ser 6, Ser 12) y otros determinantes importantes para la secreción de la lectina (Krześlak y Lipińska, 2004). En el dominio C-terminal se encuentra el CRD que consta de unos 135 residuos de aminoácidos, que es lo que define la molécula como una galectina (Krześlak y Lipińska, 2004). La secuencia Asn-Trp-Gly-Arg está presente dentro del CRD en Gal-3, el motivo de los cuatro aminoácidos es una secuencia altamente conservada en el dominio BH1 de las proteínas de la familia Bcl-2. Este motivo es crítico para la actividad antiapoptótica de Bcl-2 (Choi Kim *et al*, 1999). Gal-3 puede interactuar con moléculas que regulan la apoptosis a través de este motivo y reemplazar la actividad de Bcl-2 (Choi Kim *et al*, 1999).

Las múltiples funciones biológicas de Gal-3 dependen de su localización celular. Gal-3 extracelular media la migración celular, adhesión celular e interacciones célula-célula (Hughes, 2001), por la unión a componentes de la matriz extracelular glicosilada, y a algunas moléculas de adhesión de la superficie celular, por ejemplo, las integrinas (Krześlak y Lipińska, 2004). Mientras que Gal-3 citoplasmática regula la apoptosis (Fukumori *et al*, 2006) y señalización de supervivencia (Rabinovich *et al*, 2002) a través de la unión a proteínas como las citoqueratinas, K-Ras, chrp, Alix/AIP-1, y Bcl-2 (Krześlak y Lipińska, 2004). En el núcleo Gal-3 participa en el splicing pre-RNA (Gemin-4) (Dagher *et al*, 1995) y puede regular la expresión de genes a nivel transcripcional (ciclina D1, CREB, SP1, y TTF-1). Casi todos los ligandos intracelulares interactúan con Gal-3 a través de interacciones proteína-proteína en lugar de las interacciones lectina-glicoconjugado (Krześlak y Lipińska, 2004).

1.7.1.1 Galectina-3 en Isquemia Cerebral

En el cerebro sano se sabe que Galectina-3 (Gal-3) puede regular la migración neuronal, participar en la mielinización de oligodendrocitos y en el crecimiento de neuritas (Shin, 2013), pero hasta ahora su papel está comenzando a ser revelado. Diferentes estudios en modelos experimentales de isquemia cerebral han mostrado que, Gal-3 es sobre expresada por las células microgliales (Walther *et al*, 2000; Yan *et al*, 2009; Satho *et al*, 2011 a; Lalancette-Hebert *et al*, 2102), por lo que se ha propuesto que esta, es requerida por la microglía

para su activación y proliferación en respuesta al daño isquémico (Lalancette-Hebert *et al*, 2012), es así, que su expresión se ha correlacionado con el estado de activación de la microglía (Walter *et al*, 2000). Además, se ha propuesto como regulador en la remodelación del tejido pos- isquémico (Yan *et al*, 2009). Así también, se ha sugerido que Gal-3 contribuye a la lesión cerebral neonatal hipóxico-isquémica mediante la modulación de la respuesta inflamatoria (Doverhag *et al*, 2010). En ICG se ha observado un incremento en la expresión de Gal-3 en células microgliales posterior a la inducción de isquemia en la región CA1 del hipocampo, con un incremento máximo a las 96 h después de I/R, y cuya expresión es fuertemente disminuida al utilizar un neuroprotector como lo es la hipotermia (Satho *et al*, 2011).

Por lo tanto, la función exacta de la Gal-3 en la lesión isquémica cerebral es aún contradictoria.

1.8 Neuroprotección y Melatonina

La mayoría de los médicos han sentido frustración cuando una víctima de paro cardíaco, adecuadamente resucitada, presenta compromiso neurológico que puede ser severo o fatal. De hecho, se ha demostrado que más de 50% de los pacientes resucitados exitosamente quedan con algún compromiso neurológico (Gomez, 1991). Sabiendo esto se puede entender que diversas investigaciones estén trabajando desde hace varios años en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos generados por esta situación; así como en los procesos de reparación y reorganización de los circuitos neuronales luego de la isquemia cerebral, más recientemente, para así proponer el mejor tratamiento al paciente.

Neuroprotección en isquemia cerebral se refiere a estrategias farmacológicas o no farmacológicas aplicadas solas o en combinación, que antagonizan, interrumpen o retrasan los eventos dañinos bioquímicos y moleculares que pueden llevar al daño isquémico irreversible (Ginsberg, 2008) y/o pueden favorecer los mecanismos de plasticidad neuronal luego de isquemia. Para que la estrategia neuroprotectora sea eficaz debe iniciarse el tratamiento en un período conocido como ventana terapéutica (Pulsinelli, 1995). Un número de estrategias terapéuticas han demostrado inhibir o reducir la lesión a través

de los mecanismos anteriormente descritos. Muchas de estas estrategias incluyeron el uso de agentes farmacológicos; por ejemplo fármacos antagonistas de calcio (Haddon *et al*, 1988), antagonistas de glutamato (Selakovic *et al*, 2010), fármacos GABAérgicos (Sydserff *et al*, 2000), antioxidantes (Cervantes *et al*, 2008; Kubo *et al*, 2009), compuestos anti-inflamatorios (Yrjänheikki *et al*, 1998), inhibidores de apoptosis (He *et al*, 2002) etc. Pero a pesar de que la neuroprotección se ha demostrado en modelos animales, la traducción de la eficacia experimental en un beneficio clínico en seres humanos es una tarea difícil. En general, estas estrategias se han enfrentado: a la multiplicidad de procesos celulares que deben ser contrarrestados para prevenir o reducir el daño cerebral; el tiempo de la ventana terapéutica, aunque nadie discute que los fármacos neuroprotectores deben emplearse lo más tempranamente posible, su utilización depende de su mecanismo de acción (Fernandez-Gomez *et al*, 2008). Así mismo establecer la vía de administración óptima, la dosis eficaz neuroprotectora, y sus características farmacocinéticas (Cervantes *et al*, 2012). Hasta el 2007, 1026 fármacos fueron probados en varios modelos animales (modelos de isquemia cerebral focal y global), de los cuales solo 114 fueron sometidos a evaluación clínica (Lakhan *et al*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se han obtenido resultados concluyentes en los estudios realizados en seres humanos, es así que ICG continúa siendo un importante problema clínico con limitadas opciones terapéuticas.

Un enfoque terapéutico neuroprotector que actúa a través de varios mecanismos moleculares sería ideal, como ocurre con algunos compuestos de origen endógeno; tales como: melatonina, estradiol y la progesterona (Cervantes *et al*, 2012).

Ante las evidencias de la participación de la respuesta de células inflamatorias que incluye la liberación de mediadores inflamatorios, durante la isquemia transitoria y la reperfusión en la destrucción neuronal, la identificación de compuestos que puedan reducir o contrarrestar los efectos nocivos de estos mediadores ha sido uno de los objetivos de la investigación en este campo.

Melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina), es una molécula endógena, sintetizada a partir de triptófano, se produce principalmente por la glándula pineal, pero también por otros órganos endocrinos tales como glándula de

Harder, piel, intestino, y células del sistema inmunológico entre otras (Mauriz *et al*, 2013). Desempeña un papel importante en funciones fisiológicas tales como promoción del sueño, mantenimiento del ciclo circadiano, mejoramiento inmunológico y en el control del ciclo reproductivo estacional en mamíferos fotoperiódicos (Tocharus *et al*, 2010). Las acciones de melatonina dependen en parte de procesos dependientes de receptores (MT1, MT2, MT3 y RZR/ROR), así como de vías independientes; este último se refiere a sus funciones directas como barrido de radicales libres e interacción con proteínas citósolicas (Mauriz *et al*, 2013). Melatonina ha demostrado tener tanto efectos antioxidantes, como anti-inflamatorios (Tocharus *et al*, 2010). Su acción anti-inflamatoria se atribuye a su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno y reprimir genes pro-inflamatorios (Shi *et al*, 2012). Se ha documentado que la melatonina inhibe la expresión de las isoformas NOSi y COX y limita la producción de cantidades excesivas de NO, prostanoïdes, y leucotrienos, así como otros mediadores del proceso inflamatorio, tales como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión estos efectos, de melatonina, están relacionados con la modulación de un número de factores de transcripción y proteínas relacionadas, tales como NFκB, factor inducible por hipoxia (HIF), factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), entre otras (Mauriz *et al*, 2013).

Por su naturaleza altamente lipofílica, está atraviesa fácilmente las membranas celulares, distribuyéndose por los organelos intracelulares sin dificultad, puede llegar, a través de la circulación, a todas las células del organismo (Acuña *et al*, 2002). Esto le permite poder ubicarse en los compartimentos intracelulares y extracelulares en el SNC (Menendez-Pelaez *et al*, 1993). La actividad neuroprotectora de la melatonina no es debida solo a sus acciones antioxidantes y anti-inflamatorias sino también al mejoramiento en el funcionamiento mitocondrial, interfiere con la señalización de células pro-apopticas y participa en la preservación de la organización del neuro-citoesqueleto (Cervantes *et al*, 2008; Jiménez-Rubio *et al*, 2012). Estos efectos, y el hecho de la falta de toxicidad incluso a altas dosis, soportan su uso en la prevención contra el daño (Esposito y Cuzzocrea, 2010). Diversos estudios en modelos animales de experimentación han mostrado el efecto neuroprotector

de la melatonina en contra del daño cerebral provocado por isquemia focal (Hung *et al*, 2008; Lee *et al*, 2007; Reiter *et al*, 2005) y global (Garcia-Chavez *et al*, 2008; Letechipia-Vallejo *et al*, 2001; Letechipia-Vallejo *et al*, 2007), principalmente a través de la evaluación de parámetros morfológicos tales como; volumen del infarto y pérdida neuronal, así como funcionales tales, como déficits neurológicos y alteraciones cognitivas, tanto a corto (Cuzzocrea *et al*, 2000; Kilic *et al*, 2008) como a largo plazo (Garcia-Chavez *et al*, 2008; Letechipia-Vallejo *et al*, 2007). Inicialmente fue evaluado el efecto neuroprotector de la melatonina endógena, donde efectivamente isquemia cerebral focal transitoria en ratas pinealectomizadas resulta en un aumento en el tamaño del infarto cerebral con un mayor daño al DNA, comparadas con las ratas que tenían la glándula pineal intacta (Joo y Uz, 1998). Después de estos resultados, un gran número de estudios ha probado el efecto exógeno de la melatonina (Cuzzocrea *et al*, 2000; Garcia-Chavez *et al*, 2008; Hung *et al*, 2008; Kilic *et al*, 2008; Lee *et al*, 2007; Letechipia-Vallejo *et al*, 2007; Reiter *et al*, 2005), donde el tratamiento se ha basado en dosis única, repetidas o continuas infundidas intraperitonealmente, intravenosa u oral (Kilic *et al*, 2008) en un rango que va de los 1.5 a los 50 mg/kg, administradas durante horas a días antes o después del episodio isquémico (Cervantes *et al*, 2008).

La mayoría de estos estudios han documentado las propiedades antioxidantes de melatonina en el daño I/R. Pero poco se sabe de los efectos de melatonina sobre la respuesta inflamatoria luego de I/R. Pei y *et al*, evaluaron la influencia de la melatonina como neuroprotector, administrada 30 minutos antes de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas, sobre la concentración de NO y BHE. El tratamiento con melatonina en dosis de 1.5, 5 o 50mg/kg redujo significativamente la concentración de NO, en las regiones cerebrales afectadas en los tres casos pero no impidió el rompimiento de la BHE luego de isquemia-reperfusión (Pei *et al*, 2003). En un segundo artículo ellos documentan que una dosis única de melatonina (5mg/kg) disminuye significativamente el aumento ipsilateral de células positivas para nNOS, COX-2 o mieloperoxidasa (MPO) luego de ser sometidas a MCAO (Pei *et al*, 2004). Siguiendo con la investigación del efecto anti-inflamatorio de melatonina en isquemia cerebral Lee y colaboradores, documentaron nuevamente la protección morfológica y funcional producida por melatonina en ratas con

isquemia cerebral focal transitoria. El volumen del infarto fue menor, y el resultado neuroconductual mejorado, adicional a esto ellos observaron una respuesta inflamatoria celular disminuida en el hemisferio isquémico comparadas con las ratas que no recibieron el tratamiento neuroprotector de melatonina (Lee *et al*, 2007). Así también se ha documentado que melatonina disminuye la actividad y expresión de niveles de MMP-9, acompañada de un volumen del infarto menor, así como mejores resultados sensitivos motores en ratas con isquemia cerebral focal transitoria (Hung *et al*, 2008).

1.9 Modelos de evaluación del daño

ICG conduce a consecuencias que son principalmente observadas en tareas que examinan aprendizaje y memoria (Wang y Corbett, 1990). Déficits inducidos por lesiones en el hipocampo como ocurre en ICG, han sido manifestadas en tres mayores tipos de tareas: éstas envuelven aprendizaje espacial, memoria de trabajo y procesamiento de la información condicional (Hodges *et al*, 1997). En ratas sometidas a ICG se han observado deficiencias en la memoria de trabajo en el laberinto radial de 8 brazos de Olthou (Shibata *et al*, 2007), así como deficiencias en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Hodges *et al*, 1997). Aparte de déficits en aprendizaje y memoria, ICG en gerbos (Wang y Corbett, 1990) y ratas (Plamondon y Khan 2005; Hodges *et al*, 1997), produce cambios en la actividad locomotora después de isquemia. ICG induce hiperactividad locomotora transitoria (Block y Schwarz, 1996). Un fenómeno que algunos investigadores atribuyen a la muerte celular hipocampal inducida por la isquemia (Plamondon *et al* 2008). Así mismo, ICG por arresto cardíaco en ratas produce incremento en la ansiedad por un periodo de muchos días luego de la reperfusión (Milot y Plamondon, 2009).

Actividad locomotora y ansiedad pueden ser fácilmente medidas en la prueba de campo abierto (Milot *et al*, 2009; Block, 1999). Así incremento de la actividad exploratoria y/o incremento en la exploración al centro de la arena contra la periferia son considerados fuertes indicadores de la disminución en los niveles de ansiedad (Plamondon y Khan 2005). En base a la locomoción esta prueba ha servido para discriminar entre animales isquémicos y control SHAM,

generalmente animales isquémicos muestran un incremento en la actividad locomotora en relación a los animales control SHAM. En gerbos se ha observado este incremento en la actividad motora tempranamente entre 1-2 h y más tarde a los 60 días post- reperusión (Milot y Plamondon, 2009). En ratas con ICG está hiperactividad se ha observado a 1 día después de reperusión (Block y Schwarz, 1996). Usando un enfoque farmacológico, el tamaño de daño hipocampal y la hiperactividad puede ser reducida en paralelo (Block, 1999).

II. JUSTIFICACIÓN

La evaluación temprana del estado neurológico y la respuesta inflamatoria debida a la ICG son de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Mussack *et al*, 2001). Con base en esto, muchos estudios han identificado cambios en la expresión de ARNm de TNF- α , IL-6, y IL-10 tanto en isquemia cerebral focal (Liu *et al*, 1994; Wang *et al*, 1994; Wang *et al*, 1995) como en ICG (Saito *et al*, 1996; Zhu *et al*, 2006; Yasuda *et al*, 2011; Suzuki *et al* 1999) tempranamente en las estructuras cerebrales más vulnerables como son el hipocampo y el cuerpo estriado después de un proceso isquémico, utilizando técnicas como: Northern blot, inmunohistoquímica, RT-PCR, ELISA, entre otros.

Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de las concentraciones circulante de estas citocinas en modelos de ICG.

En ICG, el papel de Gal-3 está comenzando a ser estudiado, se ha propuesto que regula la remodelación del tejido pos- isquémico (Yan *et al*, 2009) y que su expresión se correlaciona con el estado de activación de la microglía (Walter *et al*, 2000). Es así, que actualmente no existen reportes previos de que las concentraciones de Gal-3 hayan sido directamente cuantificadas en forma circulante en modelos de ICG.

Junto con daño en la memoria espacial, hiperactividad es quizá el cambio en el comportamiento más estudiado luego de isquemia (Plamondon *et al*, 2005). Sin embargo este cambio en el comportamiento no ha sido evaluado en modelos de ICG y tratamiento neuroprotector de melatonina.

Por otro lado, otro tema que se plantea esta tesis es la neuroprotección a través de melatonina. Así pues el papel de melatonina ha sido estudiado en modelos animales de ICG y focal donde se ha observado que el tratamiento con melatonina media neuroprotección contra la lesión por I/R (Letchipia-Vallejo *et al*, 2007; Pei y Cheung, 2004). Se sabe que la melatonina actúa sobre la síntesis de NO, COX-2 y MPO que son importantes mediadores inflamatorios en modelos de isquemia focal. Sin embargo, no existen reportes de la variación de concentraciones circulantes de citocinas ni de variaciones de lectinas en particular de Gal-3 tras la administración de melatonina en isquemia cerebral global aguda.

Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

III. HIPÓTESIS

“La melatonina disminuye las concentraciones circulantes de citocinas pro-inflamatorias y Gal-3e incrementa las antiinflamatorias.”

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las concentraciones de TNF- α , IL-6, IL-10, Gal-3, circulantes y variaciones en la locomoción en ICG Aguda en ratas con y sin tratamiento neuroprotector de melatonina.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la magnitud y curso temporal de las concentraciones circulantes de Gal-3, IL-6, TNF- α e IL-10 en ratas Sprague-Dawley, sometidas a ICG aguda con y sin tratamiento neuroprotector de melatonina.
- Evaluar las variaciones en la locomoción en animales sometidos a ICG aguda con y sin tratamiento neuroprotector de melatonina en la prueba de campo abierto.
- Comparar los valores de estos parámetros en las distintas condiciones experimentales.

VI. MATERIAL

El protocolo de investigación fue aprobado por la comisión de ética e investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (publicación NIH nº 80-23, 1996). Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

- Animales: El estudio se realizó en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 350-450 g. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), con suministro de alimento y agua *ad libitum*. Para los procedimientos experimentales se utilizaron como anestésicos ketamina, xilacina y éter etílico.
- Estuches comerciales *ELISA*: Para cuantificación de las concentraciones circulantes de TNF- α , IL-6 (PeproTech), IL-10 (Quantikine) y Gal-3 (BlueGene).
- Melatonina (Sigma, St. Louis. MO. USA).
- Reactivos de grado analítico

VII.MÉTODOS

7.1 Modelo experimental de isquemia cerebral global

Se utilizó el modelo de ICG aguda por oclusión de los cuatro vasos (4VO) (Pulsinelli y Buchan, 1988). Bajo anestesia con clorhidrato de xilacina (5 mg/kg, i.p.) y ketamina (80 mg/kg, i.p.), las arterias vertebrales se ocluyeron de forma permanentemente mediante electrocauterización a través del foramen alar de la primera vértebra cervical. Las arterias carótidas comunes se aislaron y se dejaron referidas con hilo quirúrgico de seda de calibre tres ceros hasta el día de la isquemia. Inmediatamente después de la cirugía, a cada rata se le

suministro solución salina fisiológica (2ml/100g de peso corporal, s.c.) para producir hidratación post-quirúrgica y se colocaron en jaulas individuales para su recuperación. 72 horas después, bajo anestesia con éter etílico, se expusieron ambas arterias carótidas. Se interrumpió la anestesia y las arterias carótidas comunes se ocluyeron por un periodo de 15 minutos mediante clips quirúrgicos microvasculares. La interrupción del flujo sanguíneo de las arterias carótidas se verificó bajo un microscopio de cirugía. La temperatura corporal se registró y mantuvo a 37 ± 0.5 °C por medio de un cojín eléctrico. El estado de conciencia de las ratas se evaluó mediante la presencia del reflejo de enderezamiento. Solo aquellas ratas que se mantuvieron inconscientes durante la oclusión de las carótidas y por lo menos 20 minutos después posteriores a la remoción de los clips quirúrgicos microvasculares de las carótidas se incluyeron en este estudio.

7.2 Grupos y tratamiento

Las ratas se asignaron al azar en diferentes grupos.

Grupo 1 (n=7) Sham-vehículo: Animales sometidos a procedimientos anestésicos y quirúrgicos sin la interrupción del flujo sanguíneo cerebral y administración del vehículo de melatonina (solución 10% de etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min luego de la remoción de los hilos de referencia colocados en las arterias carótidas.

Grupo 2 (n=7) Sham-melatonina: Animales sometidos a procedimientos anestésicos y quirúrgicos sin la interrupción del flujo sanguíneo cerebral y administración de melatonina 10 mg/kg/h en etanol al 10% en NaCl 0.9% iv, por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min., luego de la remoción de los hilos de referencia colocados en las arterias carótidas.

Grupo 3 (n=7): Isquemia + vehículo: Animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 minutos mediante 4-VO y administración del vehículo de melatonina (solución 10% de etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas.

Grupo 4 (n=7) Isquemia + Melatonina: Animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 minutos mediante 4-VO y administración de melatonina 10 mg/kg/h en etanol al 10% en NaCl 0.9% iv, por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min., luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas.

Obtención de muestras sanguíneas

Para la obtención de muestras y administración de melatonina se realizó una canulación cardíaca a través de la vena yugular derecha. Las muestras fueron colocadas dentro de tubos Ependorf. Se tomaron 4 muestras (0.7 ml): a) Basal (tiempo cero): antes de la inducción de isquemia (animales isquémicos) o antes de la remoción de los hilos de referencia (animales Sham), b) 30 minutos, c) 6 horas y d) 24 horas: después de la remoción de los clips de las arterias carótidas (animales isquémicos) o remoción de los hilos de referencia (animales Sham).

Las muestras fueron centrifugadas (4000 rpm X15 min a 4°C) y los sueros fueron alicuotados y guardados a -70°C hasta su uso.

7.3 Cuantificación de Citocinas y Galectina-3 circulantes

Los sueros obtenidos de las muestras sanguíneas, fueron descongelados y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante se realizó la cuantificación de citocinas y Gal-3 séricas. En breve, se realizó una curva patrón con el intervalo de concentración indicado por el fabricante. Las muestras problema fueron interpoladas en la curva patrón para obtener las concentraciones séricas de la citocina o Gal-3 a evaluar.

Niveles en suero de TNF- α e IL-6 fueron determinados usando Kits PeproTech. Estos Kits emplean la técnica cuantitativa del inmuno ensayo absorbente ligado a enzimas (ELISA) tipo Sandwich. Así también la concentración sérica de IL-10 fue determinada bajo esta técnica usando un kit Quantikine. Mientras que los niveles séricos de Gal-3 fueron determinados usando un Kit Blue Gene. Este Kit emplea la técnica cuantitativa ELISA tipo competitivo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GAL3 y un conjugado GAL3-HRP.

7.4 Prueba de Campo abierto

A las 24 horas todas las ratas fueron sometidas a la prueba de campo abierto. La prueba de campo abierto consistió en colocar a los animales en una caja de acrílico rectangular (70 x 90 x 30cm). El piso fue dividido en 9 cuadrantes iguales (20 x 20 cm): 4 esquinas, 4 laterales y 1 centro. Cada animal se colocó dentro de la plataforma y se filmó su actividad por 10 minutos. Para la prueba se utilizó una iluminación tenue donde el centro estaba iluminado a 40 lux y las esquinas a 18 lux. En esta prueba se evaluaron 2 parámetros: locomoción y ansiedad. La locomoción se evaluó con el número total de cruces realizados a través de todos los cuadrantes y el tiempo de permanencia en los diferentes cuadrantes. Y la ansiedad con el número de cruces realizados al centro de la arena y el tiempo total de permanencia en el centro de la arena.

7.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Fisher, donde el valor aceptable de significancia fue menor o igual a 0.05.

VIII. RESULTADOS

TNF- α

En el presente estudio se observó que las concentraciones séricas de TNF- α no mostraron diferencias significativas antes de I/R (tiempo 0), ni a los 30 minutos después de I/R. En cambio, los valores de los niveles circulantes de TNF- α fueron significativamente menores a las 6 h luego de I/R en el grupo Isq-Mel (547 ± 23) en comparación con los grupos Isq-Veh (681 ± 18), Sham-Mel (767 ± 43) y Sham-Veh (705 ± 8); Así mismo, a las 24 h luego de I/R los valores de TNF- α de los grupos Isq-Mel (545 ± 7.4) e Isq-Veh (594 ± 29) fueron significativamente menores que en los grupos, Sham-Mel (727 ± 37) y Sham-Veh (726 ± 14 Media \pm EE).

Estas disminuciones de los valores de TNF- α en suero observados a las 6 y 24 h luego de I/R fueron significativamente menores de los valores correspondientes al tiempo 0 y 30 minutos en todas las condiciones experimentales (Figura 1).

El análisis estadístico mostro que la disminución significativa de los valores séricos de TNF- α a las 6 h en el grupo Isq-Mel con respecto a los grupos Isq-Veh, Sham-Veh y Sham-Mel (# $P < 0.05$); así como de los valores correspondientes a los grupos Isq-Veh e Isq-Mel a las 24 h. * $P < 0.05$ Isq-Mel (6 h y 24 h), Isq-Veh (24 h) con respecto a todos los grupos antes (Tiempo 0) y a los 30 minutos luego de I/R (n=5 por grupo).

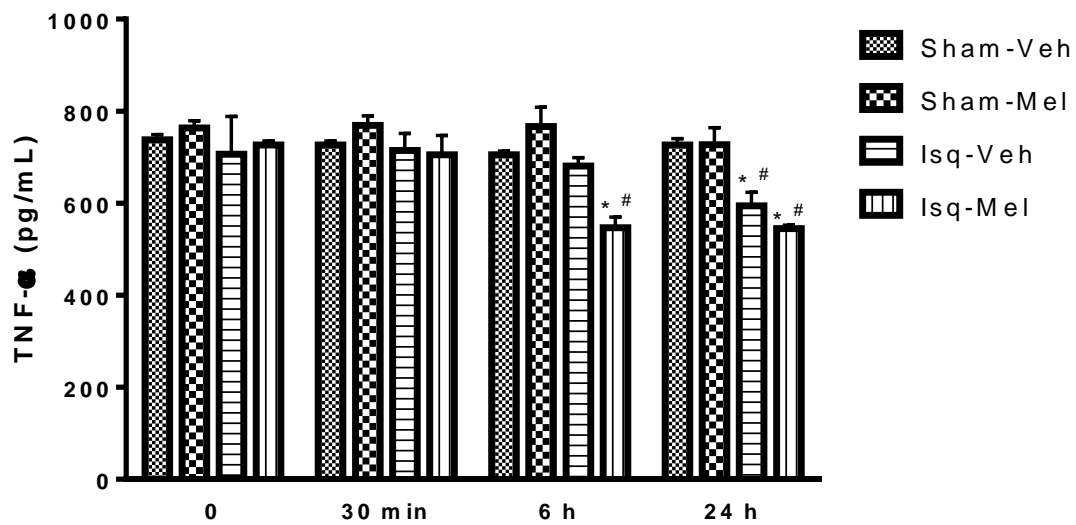


Figura 1. Valores de las concentraciones séricas (media \pm EE) de TNF- α antes (0) y a 30 minutos, 6 h y 24 h después de I/R, en los diferentes grupos experimentales. Los símbolos muestran las diferencias significativas (*, # $P < 0.05$).

IL-6

Las concentraciones séricas de IL-6 fueron significativamente mayores a las 24 h luego de I/R en el grupo Isq-Veh (2345 ± 607) que en los grupos Isq-Mel (1108 ± 387), Sham-Veh (1061 ± 156) y Sham-Mel (862 ± 88) (Figura 2).

Como lo muestra la Figura 2, el análisis estadístico mostro un incremento significativo de los valores de IL-6a las 24 h en el grupo Isq-Veh comparado con los grupos Isq-Mel Sham-Veh y Sham-Mel (# $P < 0.05$). * $P < 0.05$ Isq-Veh (24 h) con respecto a todos los grupos antes (0) y a los 30 minutos y 6 h luego de I/R (n=5 por grupo).

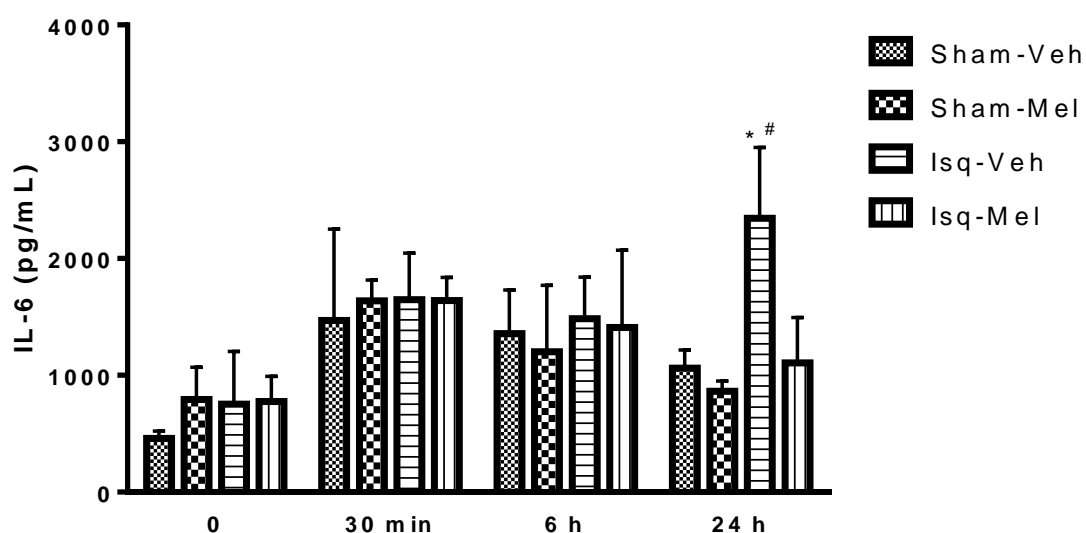


Figura 2. Valores de las concentraciones séricas (media \pm EE) de IL-6 antes (0) y a 30 minutos, 6 h y 24 h después de I/R en los diferentes grupos experimentales. Los símbolos muestran las diferencias significativas (*, # $P < 0.05$).

IL-10

Niveles circulantes de IL-10 muestran la ausencia de IL-10 en suero antes de la I/R y su presencia con grandes variaciones individuales en todas las condiciones experimentales siendo estadísticamente significativa a los 30 minutos después de I/R, para prácticamente desaparecer del suero a las 6 y 24 h posteriores a la I/R (Figura 3).

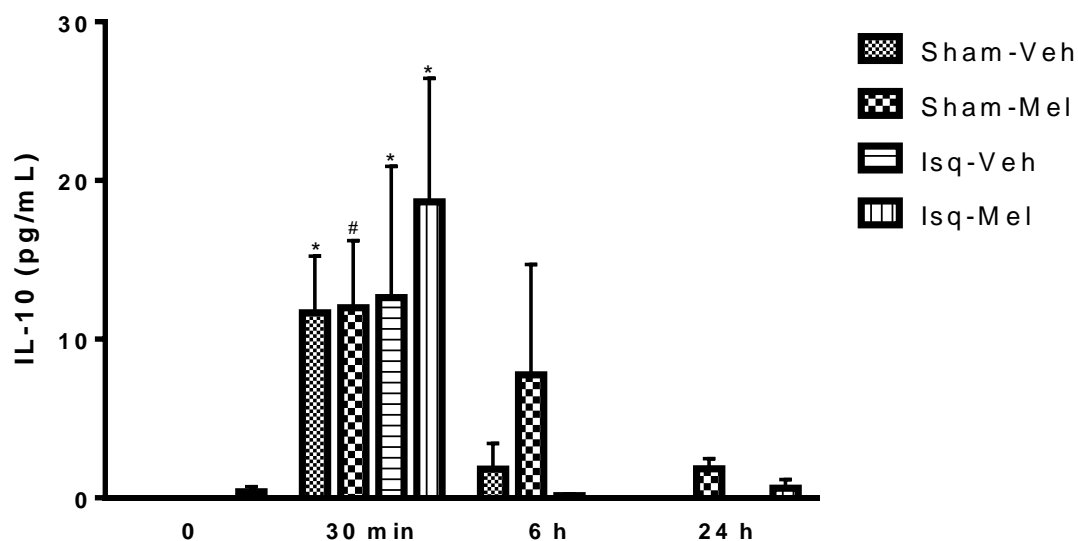


Figura3. Valores de las concentraciones séricas (media \pm EE) de IL-10 antes (0) y a 30 minutos, 6 h y 24 h después de I/R en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse que los valores de las concentraciones séricas de IL-10 a los 30 min difieren significativamente comparadas con el tiempo cero (n=5 por grupo).

Gal-3

La figura 4 muestra los resultados de las concentraciones séricas de Gal-3. Antes de la I/R (tiempo 0) no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de Gal-3. Los grupos Isq-Veh (2 ± 0.56) e Isq-Mel (2 ± 0.59) mostraron una reducción significativa de las concentraciones séricas de Gal-3 con respecto a los grupos Sham-Veh (3.6 ± 0.74) y Sham-Mel (3 ± 0.45) a los 30 minutos luego de I/R. Seis horas después de I/R se acentuó la reducción de las concentraciones séricas de Gal-3 en los grupos Isq-Veh (1 ± 0.18) e Isq-Mel (0.8 ± 0.31) y se observó además una reducción significativa de dichos valores en el grupo Sham-Mel (1.4 ± 0.27) con respecto al grupo Sham-Veh (3.3 ± 0.94). A las 24 luego de I/R persistió, aunque con menor magnitud, la reducción significativa de las concentraciones séricas de Gal-3 en los grupos Sham-Mel (3 ± 0.52) e Isq-Mel (2.4 ± 0.12) con respecto a los grupos Sham-Veh (4.6 ± 0.70) e Isq-Veh (3.8 ± 0.48). En este tiempo post I/R los valores de Gal-3 en el grupo Isq-Mel (2.4 ± 0.12) fueron significativamente menores que los del grupo Isq-Veh (3.8 ± 0.48).

Las concentraciones séricas de Gal-3 en los grupos Sham-Mel (1.4 ± 0.26), Isq-Veh ($1. \pm 0.18$) e Isq-Mel (0.84 ± 0.31) fueron significativamente menores a las 6 h posterior a I/R en comparación con los valores de los mismos grupos obtenidos antes (0), a los 30 minutos y a las 24 h luego de I/R. Los valores de Gal-3 en el grupo Isq-Veh (3.8 ± 0.5) a las 24 h fueron significativamente mayores que los valores correspondientes a los 30 minutos y 6 h luego de I/R.

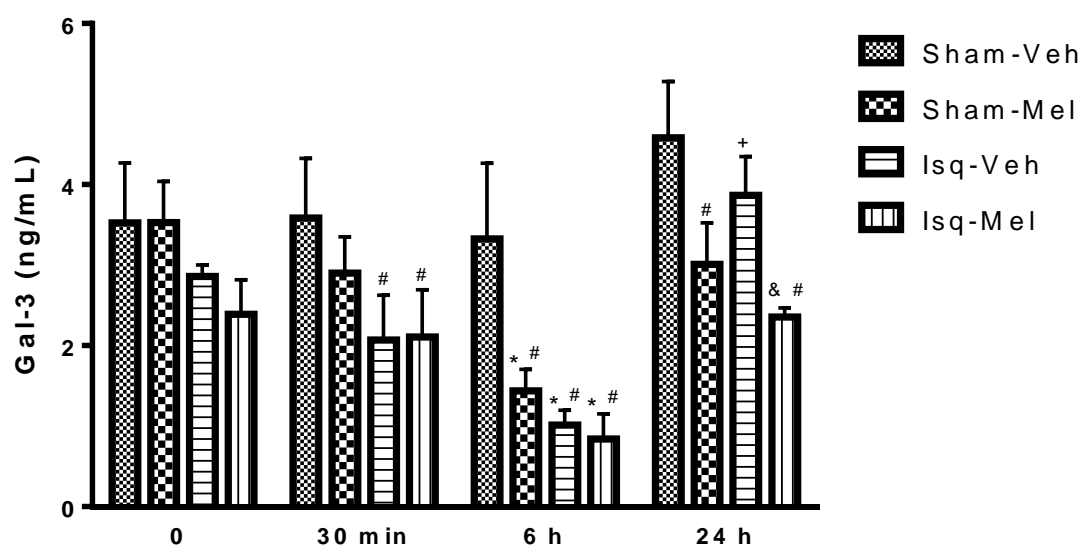


Figura 4. Valores de las concentraciones séricas (media \pm EE) de Gal-3 antes (0) y a 30 minutos, 6 h y 24 h después de I/R en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse la reducción significativa de los valores de Gal-3 a los 30 minutos y 6 h con respecto al grupo Sham-Veh, así como la reducción significativa de dichos valores en el grupo Sham-Mel a las 6 h y a las 24 h con respecto al grupo Sham-Veh y a las 24 h con respecto al grupo Isq-Veh (# $P < 0.05$). Los valores de Gal-3 resultaron significativamente menores a las 6 h en los grupos Sham-Mel, Isq-Veh e Isq-Mel a las 6 h con respecto a todos los tiempos (* $P < 0.05$). Los valores de Gal-3 resultaron significativamente mayores en el grupo Isq-Veh 24 h después de I/R que los valores correspondientes a los grupos Isq-Veh e Isq-Mel 30 minutos y 6 h luego de I/R (+ $P < 0.05$), así como la reducción significativa del grupo Isq-Mel con respecto al grupo Isq-Veh a las 24 h (& $P < 0.05$) ($n = 5$ por grupo).

Prueba de Campo abierto

Para determinar cómo la isquemia cerebral global afecta la actividad locomotora y ansiedad, en este modelo (4VO) y cómo la administración de melatonina modifica estos parámetros, se realizó la prueba de campo abierto a las 24 horas después de 4VO, la figura 5 muestra la actividad locomotora global monitoreada en un periodo de 10 minutos, de animales sham e isquémicos en la prueba de campo abierto, donde se observó que el número total de cruces del grupo isquemia vehículo (113 ± 2.87) fue significativamente mayor que los grupos isquemia melatonina (57.5 ± 12.92), sham vehículo (70.94 ± 3.56) y sham melatonina (66.66 ± 4.39).

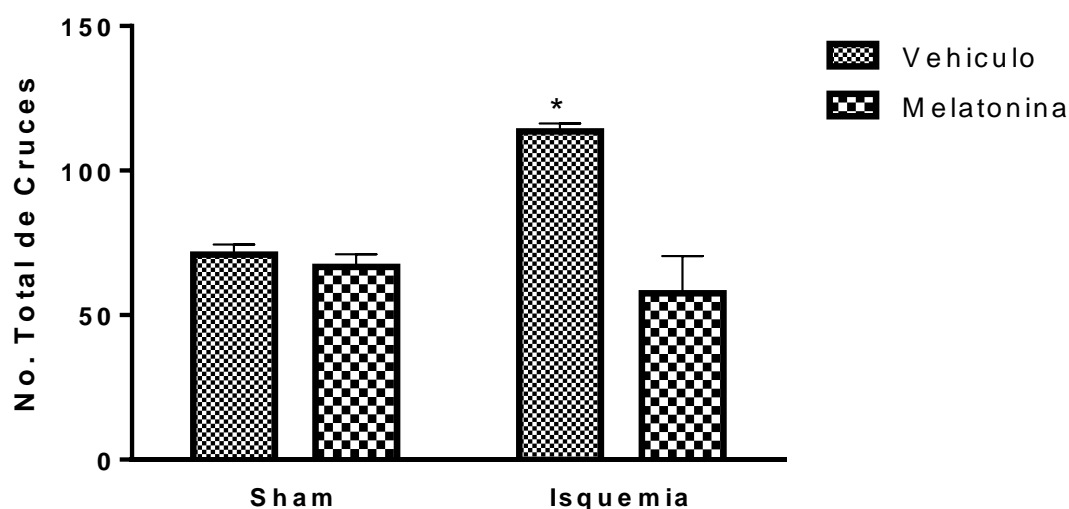


Figura 5. Actividad locomotora en grupos vehículo y tratado con melatonina 1 día después de I/R. La actividad locomotora es evaluada en términos de número total de cruces realizados a través de los cuadrantes después de 1 día de I/R. Puede observarse un incremento significativo de la actividad locomotora en el grupo Isq-Veh en comparación con los grupos control Sham e Isq-Mel. * $P < 0.0001$: Isq-Veh vs Isq-Mel, Sham-Mel y Sham-Veh (n=7 por grupo).

El número de cruces al centro de la arena fue significativamente mayor en el grupo isquemia melatonina (7.22 ± 0.89) que en los grupos isquemia vehículo (2.87 ± 1.27), sham vehículo (1.80 ± 1.01) y sham melatonina (1.44 ± 1.01), en tanto que el tiempo al centro de igual manera fue significativamente mayor en el grupo isquemia melatonina (5.30 ± 0.22) que en los grupos isquemia vehículo (2.66 ± 0.23), sham vehículo (1.42 ± 1.04) y sham melatonina (1.32 ± 0.86)(Figura 6 y 7).

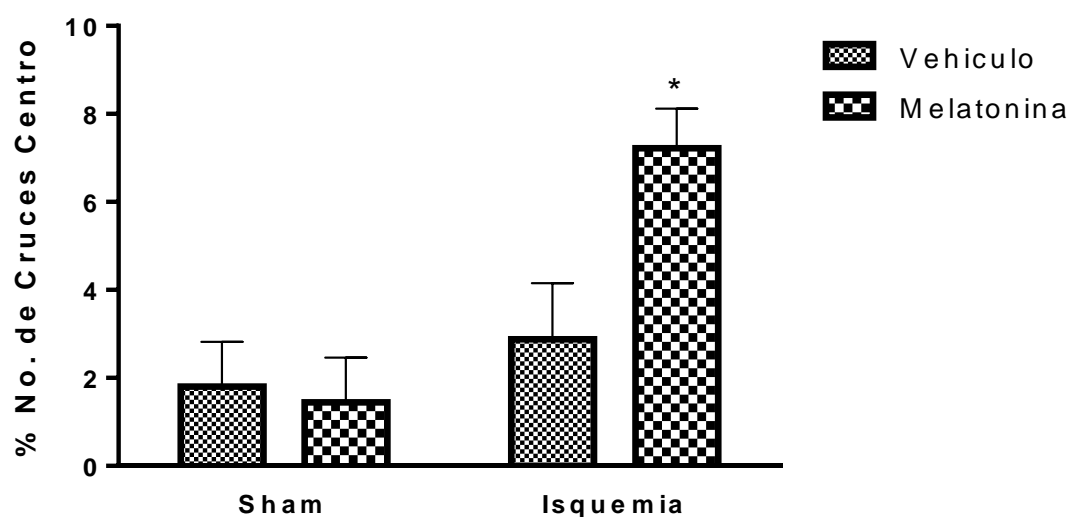


Fig. 6. Porcentaje de frecuencia centro en grupos vehículo y tratado con melatonina 1 día después de I/R. Este se calcula en términos de porcentaje del número de cruces realizados al centro respecto del total de cruces después de 1 día de I/R. Puede observarse un incremento significativo del porcentaje de número de cruces realizados al centro en el grupo Isq-Mel en comparación con los grupos control Sham-Mel, Sham-Veh e Isq-Veh. * $P < 0.05$: Isq-Mel vs Isq-Veh, Sham-Mel y Sham-Veh ($n=7$ por grupo).

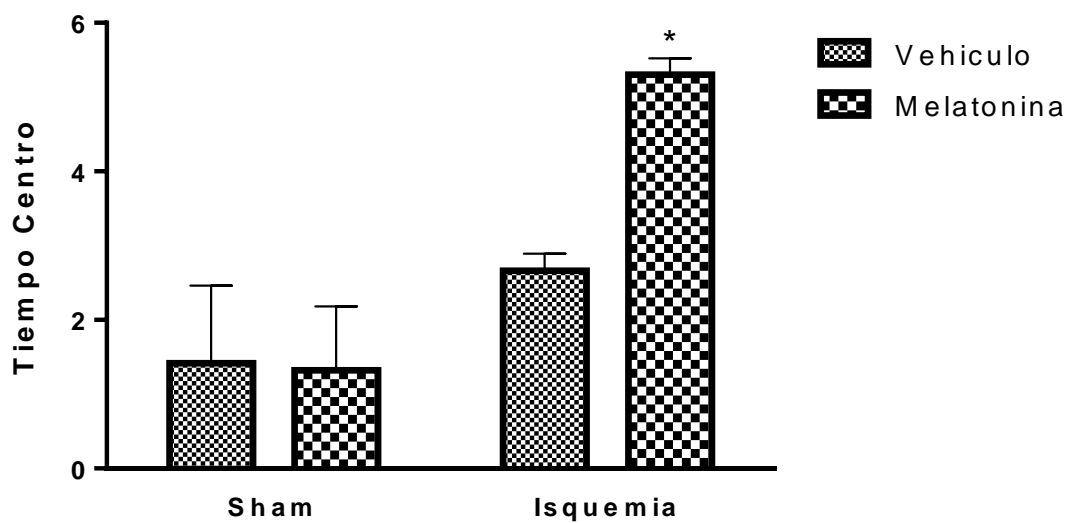


Fig. 7. Tiempo en el cuadrante del centro en grupos vehículo y tratado con melatonina 1 día después de I/R. Este se calcula en términos de tiempo de permanencia en el centro de la arena después de 1 día de I/R. Puede observarse un incremento significativo de tiempo de permanencia en el centro de la arena en el grupo Isq-Mel en comparación con los grupos control Sham e Isq-Veh. * $P < 0.0001$: Isq-Mel vs Isq-Veh, Sham-Mel y Sham-Veh; * $P < 0.0001$: Isq-Veh vs Sham-Mel y Sham-Veh ($n=7$ por grupo).

IX. DISCUSIÓN

La isquemia cerebral constituye un problema prioritario de salud por su gran prevalencia en hombres y mujeres mayores de 60 años, debido a la lesión inmediata de las estructuras cerebrales afectadas por la falta de irrigación cerebral que pueden dar lugar a la muerte de los individuos o bien a secuelas neurológicas que requieren atención médica y que afectan de manera importante la calidad de vida de los individuos que sobreviven a un episodio de isquemia cerebral.

La ICG debida a la reducción o supresión transitoria del flujo sanguíneo en todo el cerebro, ha sido motivo de muchas investigaciones tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos. En estas condiciones se ha obtenido una gran cantidad de información acerca de los procesos celulares y moleculares que ocurren en el cerebro en diferentes tiempos a partir de un evento de ICG y la subsecuente reperusión del cerebro. Esto ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos de daño cerebral, inducidos por la isquemia, (principalmente en la fase aguda), en el conocimiento de los mecanismos de reparación y plasticidad neuronal que son así mismo inducidos por el fenómeno isquémico; así como en el planteamiento de posibles procedimientos de neuroprotección que tendría como objetivos principales contrarrestar los mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral y / favorecer los mecanismos de plasticidad y restauración de las estructuras cerebrales vulnerables, afectadas por la isquemia (Lipton *et al*, 1999; Harukuni y Bhardwaj, 2006; Geocadín *et al*, 2008; Cervantes *et al*, 2012).

La evaluación de los procesos que pueden dar lugar a daño neuronal irreversible luego de ICG, muestran que la inflamación tiene una importante participación en la progresión del daño generado por la interrupción transitoria del flujo sanguíneo cerebral (Dietrich *et al*, 1984; Morioka *et al*, 1991; Stoll *et al*, 1998; Nakayama *et al*, 1998; Lipton *et al*, 1999; Lee *et al*, 2000; Lee *et al*, 2004; Chu *et al*, 2012). En efecto, muchos de estos estudios se han enfocado en las características de la respuesta inflamatoria aguda generada luego de I/R, en las estructuras cerebrales más vulnerables como son el hipocampo, la corteza

cerebral y el cuerpo estriado, donde se ha identificado la participación de citocinas pro-inflamatorias tales como, IL-1, TNF- α e IL-6 que son mediadores importantes para la respuesta inflamatoria que forma parte de los mecanismos fisiopatológicos de daño isquémico (Minami *et al*, 1992; Saito *et al*, 1996; Yoshimoto *et al*, 1997; Suzuki *et al*, 1999; Zhu *et al*, 2006; Yasuda *et al*, 2011). Así mismo se ha reportado que la inhibición de la actividad de dichas citocinas mediante procedimientos farmacológicos o no farmacológicos reduce el daño que de otra manera sería inducido por la isquemia, por lo que se ha considerado a los mecanismos inflamatorios post isquemia como un posible blanco para el tratamiento neuroprotector en los casos de ICG (Altay *et al*, 2007; Webster *et al*, 2009; Meybohm *et al*, 2010).

Por otra parte se ha mostrado que las concentraciones séricas de diferentes citocinas pro-inflamatorias se incrementa en ratas sometidas a isquemia cerebral focal por oclusión permanente o transitoria de la arteria cerebral media (Tu *et al*, 2010; Li *et al*, 2007), en ratas sometidas a ICG mediante paro cardíaco (Callaway *et al*, 2008); así como en pacientes con infarto cerebral (Fassbender *et al*, 1994; Beamer *et al*, 1995; Smith *et al*, 2004). Sin embargo, no se ha investigado las modificaciones de las concentraciones séricas de las citocinas involucradas en el proceso inflamatorio inducido por la ICG en el cerebro, en el modelo de ICGA mediante oclusión de los 4 vasos. En el caso de que las modificaciones de las concentraciones séricas de citocinas pro-inflamatorias estuviesen relacionadas con las modificaciones y curso temporal de la expresión y actividad de mediadores de inflamación inducidos por la ICGA, la determinación de las concentraciones séricas de citocinas y otros mediadores de inflamación podrían ser parámetros del efecto neuroprotector de fármacos con mecanismo de acción anti-inflamatorio. Asimismo, la identificación del curso temporal de las variaciones de las concentraciones séricas de mediadores de la respuesta inflamatoria asociados a la isquemia cerebral podría sustentar la propuesta de la duración de la ventana de oportunidad terapéutica para procedimientos neuroprotectores anti-inflamatorios.

La melatonina es un compuesto endógeno cuyo efecto neuroprotector ha sido probado en varios estudios en modelos experimentales de Isquemia Cerebral (Letechipia-Vallejo *et al*, 2001; Letechipia-Vallejo *et al*, 2007; García-Chávez *et al*, 2008; Reiter *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007; Hung *et al*, 2008). La actividad neuroprotectora de la melatonina ha sido atribuida a sus acciones antioxidantes, anti-inflamatorias, mejoramiento en el funcionamiento mitocondrial, interferencia con la señalización de fenómenos pro-apoptóticos y preservación de la organización del neuro-citoesqueleto (Cervantes *et al*, 2008; Jiménez-Rubio *et al*, 2012). Aunque algunos estudios del efecto neuroprotector de la melatonina en isquemia cerebral han documentado un efecto anti-inflamatorio evaluando marcadores como NO, COX-2, MMP y respuesta celular disminuida (Pei *et al*, 2003; Pei *et al*, 2004; Lee *et al*, 2007), hasta el momento no ha descrito el efecto de melatonina sobre citocinas ni lectinas en periodos inmediatos al evento de isquemia cerebral global y reperfusión.

El modelo de ICGA por oclusión de 4-VO ha sido ampliamente utilizado y se ha mostrado que la interrupción transitoria del flujo sanguíneo cerebral (durante 15 min en el presente estudio) provoca la muerte de una gran proporción de neuronas piramidales principalmente en el segmento CA1 en el hipocampo, en las capas 3 y 5 de la corteza cerebral, células de Purkinje del cerebelo y otros tipos celulares en el cuerpo estriado, mediante un proceso multifactorial que se desarrolla en el término de horas a días después de la isquemia, y su magnitud esta en relación directa con la duración de la isquemia (Letechipia-Vallejo *et al*, 2007; Cervantes *et al*, 2012).

En cuanto al proceso inflamatorio que forma parte de la fisiopatología del daño cerebral inducido por la isquemia, se sabe que TNF- α es una citocina pro-inflamatoria implicada en el desarrollo de daño luego de I/R (Pantoni *et al*, 2008, Maddahi *et al*, 2011, Whitney *et al*, 2009). Esta citocina se incrementa significativamente llegando a un máximo en el término de 1 h para reducirse progresivamente hasta valores significativamente menores a las 24 h, luego de 30 min de I/R inducida por 4VO. Se ha sugerido que dicho incremento resulta a su vez de la actividad de factores de transcripción tales como Fos y NFkB en respuesta al estrés por reperfusión (Yoshimoto *et al*, 1997). En nuestro estudio

no se observó un incremento de esta citocina luego de 30 min y 6 h a partir de la I/R; sin embargo el tratamiento con melatonina provocó una reducción significativa de las concentraciones séricas de ésta citocina a las 6 h luego de I/R, que corresponde a la parte final del tratamiento neuroprotector con melatonina utilizado en el presente estudio. Estos resultados sugieren que, la melatonina puede tener un efecto anti-inflamatorio a través de la reducción de TNF- α que es considerada como una citocina pro-inflamatoria; asumiendo que las concentraciones plasmáticas de TNF- α tengan relación con las concentraciones cerebrales de esta citocina. Por otra parte la reducción significativa de las concentraciones séricas de TNF- α observadas en el siguiente estudio, tanto en el grupo Isq-Veh como en el grupo Isq-Mel, parecen corresponder al mismo fenómeno que ha sido observado en las concentraciones cerebrales de dicha citocina 24 h después de la I/R (Yoshimoto *et al*, 1997). El efecto anti-oxidante de la melatonina atribuido a su capacidad para atrapar a las especies reactivas de oxígeno y la modulación concomitante de la expresión y actividad de genes y factores pro-inflamatorios (Fos y NFkB), que se incrementan luego de ICGA (Lipton *et al*, 1999), pudiera estar relacionado con el efecto anti-inflamatorio de la melatonina (Shi *et al*, 2012).

Al igual que TNF- α , IL-6 es una citocina que participa como mediador inflamatorio durante la fase aguda y como mediador neurotrófico en las fases subaguda y tardía (Suzuki *et al*, 2009). Esta citocina se incrementa significativamente a las 24 h luego de 10 min (en el hipocampo) y 30 min (homogenados de cerebro) a partir de I/R inducida por 4VO (Yasuda *et al*, 2011; Yoshimoto *et al*, 1997). En el presente estudio, a partir de las concentraciones séricas de IL-6, se observó el mismo fenómeno descrito por estos autores en las concentraciones cerebrales de esta citocina; esto es, un incremento significativo en las concentraciones séricas a las 24 h luego de I/R. En estas condiciones, el tratamiento neuroprotector con melatonina produjo una disminución significativa de las concentraciones séricas de IL-6 a las 24 h, sustentando el efecto anti-inflamatorio de melatonina a través de la reducción de IL-6.

En varios estudios se ha sugerido que el efecto anti-inflamatorio de la melatonina puede estar mediado por el incremento en la cantidad y la actividad anti-inflamatoria de IL-10 que se ha observado en diferentes condiciones de daño inflamatorio (choque séptico, envejecimiento, infarto cardíaco), bajo tratamiento con melatonina (Carrillo-Vico *et al*, 2005; Kireev *et al*, 2008; Lin *et al*, 2011). Sin embargo en el presente estudio no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos que pudieran sustentar cambios en la concentración sérica de IL-10 debidas a la isquemia o al tratamiento neuroprotector con melatonina. No obstante las maniobras experimentales en los grupos Sham, así como la isquemia cerebral antes del tratamiento con melatonina (30 min a partir de I/R) dieron lugar a un incremento de las concentraciones séricas de IL-10 en comparación con los mismos grupos antes de iniciar los procedimientos experimentales, con grandes variaciones individuales incompatibles con valores de significancia estadística.

Los cambios en la expresión de Gal-3 en la microglía del cerebro se ha relacionado con las acciones neuroprotectores de la hipotermia y los efectos promotores del daño cerebral de la hipertermia en modelos experimentales de isquemia cerebral en el gerbo. Se ha sugerido que el efecto neuroprotector se asocia con disminución en la expresión de Gal-3 en tanto que el mayor daño por isquemia se asocia al incremento en la expresión de Gal-3 de estructuras cerebrales tales como el hipocampo muy vulnerables a la isquemia (Satho *et al*, 2011 a, b). Por otro lado, el papel de Gal-3 en el daño cerebral o la neuroprotección mediada por el desarrollo o la interferencia con los procesos inflamatorios asociados a la isquemia ha sido motivo de discusión (Lalancette-Hébert *et al*, 2012). Los resultados del presente estudio sugieren que la sola isquemia cerebral es capaz de inducir una reducción de las concentraciones plasmáticas de Gal-3 a partir de los 30 min de I/R con una reducción máxima a las 6 h luego de I/R; a este respecto, cabe mencionar que en otras condiciones de daño celular mediada por procesos inflamatorios la reducción de Gal-3 se ha atribuido a los efectos de las especies reactivas de oxígeno sobre la expresión de Gal-3 (Liu *et al*, 1995). Por otra parte parece ser que la sola administración de melatonina también da lugar a la reducción de las concentraciones séricas de Gal-3 como lo muestra la reducción de este

parámetro en el grupo Sham luego de 6 h de infusión continua de melatonina. La contribución de la isquemia y del tratamiento neuroprotector de melatonina a la reducción de las concentraciones séricas de Gal-3, y el significado de dicha reducción en modelos experimentales de isquemia y neuroprotección queda como una interrogante que debe ser abordado por estudios posteriores. Si asumimos que la reducción de gal-3 inducida por melatonina fuera parte de los mecanismos de neuroprotección cabría argumentar que en modelos experimentales de daño celular la reducción de Gal-3, se relaciona con menor daño (Yu *et al*, 2013; Bertocchi *et al*, 2008; Zuberi *et al*, 2004).

En el presente trabajo se muestra que la melatonina reduce la concentración sérica de esta proteína, lo que por sí mismo representa una aportación en éste campo del conocimiento, ya que no existen estudios respecto a la variación de Gal-3 circulante bajo los efectos de melatonina. Un posible mecanismo por el que la melatonina influye sobre las concentraciones séricas de Gal-3 puede estar relacionado con la regulación a la alza de proteínas Bcl2 en condiciones de isquemia y bajo tratamiento con melatonina (Ling *et al*, 1999). En este sentido Gal-3 es capaz de interactuar con proteínas tales como Bcl-2 a través de la secuencia Asn-Trp-Gly-Arg (Choi Kim *et al*, 1999), donde puede estar siendo reconocida por Bcl-2 y estar siendo ubicada dentro de las células, lo cual reduciría las concentraciones extracelulares de Gal-3. Bajo esta misma hipótesis podría plantearse la disminución de Gal-3 en el grupo Isq-veh a las 6 h ya que se ha reportado que la sola isquemia es capaz de incrementar a Bcl2 a las 6 h luego de I/R y disminuirla a las 24 h (Zhang *et al*, 2004).

En cualquier caso la reducción de las concentraciones séricas de Gal-3 atribuible a la isquemia y/o al tratamiento con melatonina es un fenómeno transitorio ya que las concentraciones séricas de Gal-3 recuperan sus valores iniciales 24 h después de I/R.

Por otra parte las características de movilidad de las ratas en la prueba de campo abierto han sido consideradas como un indicador de la presencia y magnitud de la lesión del hipocampo, atribuible a la isquemia (Plamondon *et al*, 2008; Kuroiwa *et al*, 1991; Plamondon y Khan, 2005; Wang y Corbett, 1990).

En el presente trabajo, en efecto el tratamiento con melatonina impidió el incremento de la movilidad, evaluado mediante el número de cruces por cuadrantes en el campo abierto que fue observado en los animales isquémicos tratados con vehículo, lo que indica que los animales tratados con melatonina tuvieron menor daño en el hipocampo 24 h después del episodio isquémico. Disminución en la actividad locomotora posterior al tratamiento neuroprotector de melatonina ha sido reportada solo en gerbos sometidos a ICG por el modelo de oclusión bilateral de las arterias carótidas, a las 24, 48 y 72 h en administración aguda y crónica de melatonina (Cuzzocrea *et al*, 2000; Rennie *et al*, 2008). Adicionalmente la evaluación del tiempo de permanencia en el cuadrante central de la prueba de campo abierto sugiere diferencias en el estado de ánimo de los animales isquémicos tratados con melatonina en comparación con los animales isquémicos tratados con vehículo ya que de acuerdo con la interpretación de la prueba el mayor tiempo de permanencia en el centro del campo corresponde a un estado de menor ansiedad en los animales isquémicos tratados con melatonina. Este efecto ansiolítico de melatonina ha sido reportado solo en isquemia cerebral focal en ratones a los 6 y 29 días (Kilic *et al*, 2008).

X. CONCLUSIONES

En condiciones de ICGA las concentraciones séricas de TNF-a, IL-6, IL-10 pueden reflejar la magnitud y curso temporal del proceso inflamatorio involucrado en el daño cerebral inducido por la isquemia y las modificaciones atribuibles al tratamiento neuroprotector con melatonina

En cambio, el posible significado de las concentraciones séricas de Gal-3 y su curso temporal antes de 24 h a partir del episodio de ICGA amerita estudios adicionales pendientes a evaluar la participación de Gal-3 en el proceso inflamatorio pos isquemia directamente en el tejido cerebral.

La evaluación conductual del daño cerebral inducido por la isquemia muestra en el presente estudio el efecto neuroprotector de la melatonina que parece estar relacionado con las características de las concentraciones séricas de parámetros del proceso inflamatorio pos isquemia.

XI. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo muestran que melatonina es capaz de disminuir los valores séricos de TNF- α e IL-6 inducidos por I/R. Por lo que se sugiere evaluar si la capacidad de melatonina para modular las concentraciones séricas de IL-6 y TNF- α observada aquí, puede ser observada *in situ* mediante la cuantificación de la proteína en el cerebro. El tener una correlación de los valores *in situ*, junto con las concentraciones séricas de estas citocinas nos permitirá saber si la determinación de las concentraciones en suero de estas citocinas podría ser considerado como un parámetro del efecto neuroprotector de fármacos con mecanismo de acción anti-inflamatorio.

Así también se tomaron muestras de suero y se recolectaron los cerebros de los animales que no cumplieron con el criterio de inclusión de permanencia en estado de inconsciencia durante los 15 minutos de la isquemia o bien durante los primeros 20 minutos de reperfusión, los cuales fueron agrupados en tres grupos: a) Animales que permanecieron inconscientes de 1 a 5 min; b) Animales que permanecieron inconscientes de 6 a 10 min; c) Animales que permanecieron inconscientes de 11 a 15 min. Para el análisis de estas muestras, se está considerando realizar la cuantificación sérica y en cerebro de TNF- α e IL-6 para observar si hay una correlación entre el tiempo de isquemia y las concentraciones de estas citocinas.

Para demostrar la hipótesis de que melatonina disminuye las concentraciones séricas de Gal-3, mediante el incremento de Bcl-2, es necesario evaluar los niveles de Bcl2 *in situ* y mejor aún, realizar una colocalización Bcl2/Gal-3 mediante inmunohistoquímica, para observar si efectivamente Gal-3 está siendo reconocida por Bcl-2. Particularmente, nosotros hemos recolectado los cerebros de todos los animales utilizados en este estudio, tomados a las 24 h (5 cerebros/ grupo) y 72 horas (2 y 3 cerebros/ grupo) post isquemia.

Así mismo se sugiere hacer análisis específicos de radicales libres sobre Gal-3.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, D., Macías, M., Crespo, E., Arauzo, M., León, J., Martín, M., y Escames, G. (2002). Potenciales efectos de la melatonina en el envejecimiento. *M. Est Ed.*
2. Altay, T., McLaughlin, B., Wu, J. Y., Park, T. S., y Gidday, J. M. (2007). Slit modulates cerebrovascular inflammation and mediates neuroprotection against global cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 207(2), 186-194.
3. Ames, A., 3rd, Wright, R. L., Kowada, M., Thurston, J. M., y Majno, G. (1968). Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*, 52(2), 437-453.
4. Anaya, J. (2003). Descripción Molecular del TNF- α . *Reumatología*, 19(2), 112-120.
5. Arimoto, T., Choi, D. Y., Lu, X., Liu, M., Nguyen, X. V., Zheng, N., Bing, G. (2007). Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Neurobiol Aging*, 28(6), 894-906.
6. Arribas-Prieto, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Gravi, J. M., Matias-Guiu, J., Roda, J. M., y Barcia-Albacar, J.A. (2008). Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol*, 47, 416-426.
7. Bacon, K. B., y Harrison, J. K. (2000). Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol*, 104, 92-97.
8. Basco, L. , Fariñas, S., y Hidalgo, M. Á. (2011). Enfermería y la presión intracraneal. *Rev Científica de la Sociedad Española de Enfermería de la Sociedad Española*, 17: 17.
9. Beamer, N. B., Coull, B. M., Clark, W. M., Hazel, J. S., y Silberger, J. R. (1995). Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol*, 37(6), 800-805.
10. Bertocchi, A. P., Campanhole, G. , Mei Wang, P. H., Gonçalves, G. M., Damiao, M. J., Cenedeze, M. A., Camara, N. O. (2008). A Role for galectin-3 in renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Journal compilation*, 21, 999-1007.
11. Block, F. (1999). Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*, 58(3), 279-295.
12. Block, F., y Schwarz, M. (1996). Dextromethorphan reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res*, 741, 153-159.
13. Brait, V. H., Arumugam, T. V., Drummond, G. R., y Sobey, C. G. (2012). Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(4), 598-611.
14. Callaway, C. W., Rittenberger, J. C., Logue, E. S., y McMichael, M. J. (2008). Hypothermia after cardiac arrest does not alter serum inflammatory markers. *Crit Care Med*, 36(9), 2607-2612.
15. Carrillo-Vico, A., Lardone, P. J. , Naji, L., Fernández-Santos, J. M., Lacave, I. M. , Guerrero, J. M. , y Calvo, J. R. (2005). Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/antiinflammatory cytokine network, protection

- against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res*, 39, 400-408.
16. Cervantes, M., González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., Olvera-Cortés, M.E., y Morali, G. (2012). Neuroprotection in Animal Models of Global Cerebral Ischemia. *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke* (pp. 305-345). Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/advances-in-the-preclinical-study-of-ischemic-stroke/experimental-approach-of-neuroprotection-in-animal-models-of-cerebral-ischemia>.
 17. Cervantes, M., Morali, G., y Letechipia-Vallejo, G. (2008). Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res*, 45(1), 1-7.
 18. Cuenca-López, M. D., Brea, D., Galindo, M. F., Antón-Martínez, D., Sanz, M. J., Agulla, J., Jordán, J. (2010). Respuesta inflamatoria durante los procesos de isquemia: moléculas de adhesión e inmunomodulación. *Rev Neurol*, 51(1), 30-40.
 19. Cuzzocrea, S., Costantino, G., Gitto, E., Mazzon, E., Fulia, F., Serraino, I., Caputi, A. P. (2000). Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. *J Pineal Res*, 29(4), 217-227.
 20. Czeh, M., Gressens, P., y Kaindl, A. M. (2011). The Yin and Yang of Microglia. *Developmental Neurosci*, 33(3-4), 199-209.
 21. Chakraborty, S., Kaushik, D. K., Gupta, M., y Basu, A. (2010). Inflammasome Signaling At The Heart Of Central Nervous System Pathology. *J Neurosci Res*, 88(8), 1615-1631.
 22. Chen, H., Chopp, M., Jiang, Q., y Garcia, J. H. (1992). Neuronal damage, glial response and cerebral metabolism after hypothermic forebrain ischemia in the rat. *Acta Neuropathol*, 84(2), 184-189.
 23. Cheung, R. T. (2003). The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res*, 34(3), 153-160.
 24. Choi Kim, H-R., Lin, H-M., Biliran, H., y Raz, A. (1999). Cell Cycle Arrest and Inhibition of Anoikis by Galectin-3 in Human Breast Epithelial Cells. *Cancer Res*, 59, 4148-4154.
 25. Chu, K., Yin, B., Wang, J., Peng, G., Liang, H., Xu, Z., Luo, B. (2012). Inhibition of P2X7 receptor ameliorates transient global cerebral ischemia/reperfusion injury via modulating inflammatory responses in the rat hippocampus. *J Neuroinflammation*, 9, 69.
 26. Dagher, S. F., Wang, J. L., y Patterson, R. J. (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4), 1213-1217.
 27. Denes, A., Thornton, P., Rothwell, N. J., y Allan, S. M. (2010). Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun*, 24(5), 708-723.
 28. Dietrich, W. D., Busto, R., y Bethea, J. R. (1999). Postischemic hypothermia and IL-10 treatment provide long-lasting neuroprotection of CA1 hippocampus following transient global ischemia in rats. *Exp Neurol*, 158(2), 444-450.
 29. Dietrich, W. D., Busto, R., y Ginsberg, M. D. (1984). Cerebral endothelial microvilli: formation following global forebrain ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol*, 43(1), 72-83.

30. Díez-Tejedor, E., Del Brutto, O., Álvarez- Sabin, J., Muñoz, M., y Abiusi, G. (2001). Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol*, 33, 455-464.
31. Doverhag, C., Hedtjarn, M., Poirier, F., Mallard, C., Hagberg, H., Karlsson, A., y Savman, K. (2010). Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis*, 38(1), 36-46.
32. Erta, M., Quintana, A., y Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*, 8(9), 1254-1266.
33. Esposito, E., y Cuzzocrea, S. (2010). Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol*, 8(3), 228-242.
34. Farooqui, Tahira. (2011). Janus Face of Neuroinflammation: Role in Neural Cell Survival and Death. <http://www.scienceboard.net/community/perspectives.189.html>
35. Fassbender, K., Rossol, S., Kammer, T., Daffertshofer, M., Wirth, S., Dollman, M., y Hennerici, M. (1994). Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci*, 122(2), 135-139.
36. Fernandez-Gomez, F. J., Hernandez, F., Argandona, L., Galindo, M. F., Segura, T., y Jordan, J. (2008). Pharmacology of neuroprotection in acute ischemic stroke. *Rev Neurol*, 47(5), 253-260.
37. Fukumori, T., Oka, N., Takenaka, Y., Nangia-Makker, P., Elsamman, E., Kasai, T., Raz, A. (2006). Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Res*, 66(6), 3114-3119.
38. Gallego del Sol, F., Nagano, S., Celso-Cavada, S., Benildo, H., Sanz Libia, A., y Calvete, J.J. (2006). Lectinas. *Investigación y Ciencia*, 58-67.
39. Garau, A., Bertini, R., Colotta, F., Casilli, F., Bigini, P., Cagnotto, A., Villa, P. (2005). Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine*, 30(3), 125-131.
40. Garcia-Chavez, D., Gonzalez-Burgos, I., Letechipia-Vallejo, G., Lopez-Loeza, E., Morali, G., y Cervantes, M. (2008). Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Letters*, 448(1), 148-152.
41. Gehrmann, J., Banati, R. B., Wiessner, C., Hossmann, K. A., y Kreutzberg, G. W. (1995). Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathol Appl Neurobiol*, 21(4), 277-289.
42. Geocadin, R. G., Koenig, M. A., Jia, X., Stevens, R. D., y Peberdy, M. A. (2008). Management of brain injury after resuscitation from cardiac arrest. *Neurol Clin*, 26(2), 487-506, ix.
43. Ginsberg, M. D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55(3), 363-389.
44. Gomez, L.M. (1991). Fisiología y preservación cerebral durante el paro cardíaco vulnerabilidad del cerebro a la anoxia-isquemia. *Iatreia*, 4(3), 139-146.

45. González, J. M., y Toro, J. (2007). La neuroglia en la respuesta inmune del sistema nervioso central. *Acta Neurol Colomb*, 23, 25-30.
46. Graeber, M. B., Streit, W. J., y Kreutzberg, G. W. (1988). Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res*, 21(1), 18-24.
47. Granger, D. N., y Kubes, P. (1994). The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 55(5), 662-675.
48. Haddon, W. S., Prough, D. S., Kong, D., y Petrozza, P. (1988). Effects of nimodipine on the production of thromboxane A2 following total global cerebral ischemia. *J Neurosurg*, 69(3), 416-420.
49. Harukuni, I., y Bhardwaj, A. (2006). Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin*, 24(1), 1-21.
50. He, Z., He, Y. J., Day, A. L., y Simpkins, J. W. (2002). Proestrus levels of estradiol during transient global cerebral ischemia improves the histological outcome of the hippocampal CA1 region: perfusion-dependent and-independent mechanisms. *J Neurol Sci*, 193(2), 79-87.
51. Hirko, A. C., Dallasen, R., Jomura, S., y Xu, Y. (2008). Modulation of inflammatory responses after global ischemia by transplanted umbilical cord matrix stem cells. *Stem Cells*, 26(11), 2893-2901.
52. Hochmann, B, Coelho, J, Segura, J, Galli, M, Ketzoian, C, y Pebet, M. (2006). Incidencia del accidente cerebrovascular en la ciudad de Rivera, Uruguay. *Rev Neurol*, 43(2), 78-83.
53. Hodges, H., Nelson, A., Virley, D., Kershaw, T. R., y Sinden, J. D. (1997). Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: prospects for transplant therapy. *Pharmacol Biochem Behav*, 56(4), 763-780.
54. Hossmann, K. A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*, 36(4), 557-565.
55. Hughes, C. R. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, 83(7), 667-676.
56. Hung, Y. C., Chen, T. Y., Lee, E. J., Chen, W. L., Huang, S. Y., Lee, W. T., Wu, T. S. (2008). Melatonin decreases matrix metalloproteinase-9 activation and expression and attenuates reperfusion-induced hemorrhage following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res*, 45(4), 459-467.
57. Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*, 20, 132-139.
58. INEGI. (2011). Defunciones generales – Principales causas de mortalidad por residencia habitual, sexo y grupo de edad del fallecido-2008 nacional. Retrieved 24/11/2011, 2011, from <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob45&c=3222>.
59. Jacobs, A. H., Tavitian, B., y consortium, I. NMIIND. (2012). Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(7), 1393-1415.
60. Jimenez-Rubio, G., Ortiz-Lopez, L., y Benitez-King, G. (2012). Melatonin modulates cytoskeletal organization in the rat brain hippocampus. *Neurosci Letters*, 511(1), 47-51.

61. Johansson, B. B., y Grabowski, M. (1994). Functional recovery after brain infarction: plasticity and neural transplantation. *Brain Pathol*, 4(1), 85-95.
62. Joo, J. Y., Uz, T., y Manev, H. (1998). Opposite effects of pinealectomy and melatonin administration on brain damage following cerebral focal ischemia in rat. *Restor Neurol Neurosci*, 13(3-4), 185-191.
63. Kato, H. (2001). The role of microglia in ischemic brain injury. Inflammation and Stroke. *Progress in Inflammation Res*, 89-99.
64. Kawamata, T., Dietrich, W. D., Schallert, T., Gotts, J. E., Cocke, R. R., Benowitz, L. I., y Finklestein, S. P. (1997). Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15), 8179-8184.
65. Kilic, E., Kilic, U., Bacigaluppi, M., Guo, Z., Ben Abdallah, N., Wolfer, D. P., Bassetti, C. L. (2008). Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res*, 45(2), 142-148.
66. Kireev, R. A., Tresguerres, A. C. F., Garcia, C., Ariznavarreta, C., Vara, E., y Tresguerres, J. A. F. (2008). Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res*, 45(4), 394-402.
67. Kochanek, P. M., y Hallenbeck, J. M. (1992). Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*, 23(9), 1367-1379.
68. Kogure, K., Tanaka, J., y Araki, T. (1988). The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. The membrane theory. *Neurochem Pathol*, 9, 145-170.
69. Krzeslak, A., y Lipinska, A. (2004). Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*, 9(2), 305-328.
70. Kubo, K., Nakao, S., Jomura, S., Sakamoto, S., Miyamoto, E., Xu, Y., Shingu, K. (2009). Edaravone, a free radical scavenger, mitigates both gray and white matter damages after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 1279, 139-146.
71. Kuroiwa, T., Bonnekoh, P., y Hossmann, K. A. (1991). Locomotor hyperactivity and hippocampal CA1 injury after transient forebrain ischemia of gerbils. *Neurosci Letters*, 122(2), 141-144.
72. Kusum, K., y Thomas, E. A. Effect of hypothermia on microglial reaction in ischemic brain. *Clinical Neurosci and Neuropathology*, 8(4), 947-950.
73. Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., y Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*, 7, 97.
74. Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y. C., y Kriz, J. (2007). Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*, 27(10), 2596-2605.
75. Lalancette-Hebert, M., Swarup, V., Beaulieu, J. M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y. C., Kriz, J. (2012). Galectin-3 Is Required for Resident Microglia Activation and Proliferation in Response to Ischemic Injury. *J Neurosci*, 32(30), 10383-10395.

76. Lee, J. M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J., y Choi, D. W. (2000). Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*, 106(6), 723-731.
77. Lee, M. Y., Kuan, Y. H., Chen, H. Y., Chen, T. Y., Chen, S. T., Huang, C. C., Lee, E. J. (2007). Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res*, 42(3), 297-309.
78. Lee, S. R., Tsuji, K., Lee, S. R., y Lo, E. H. (2004). Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci*, 24(3), 671-678.
79. Lehmberg, J., Beck, J., Baethmann, A., y Uhl, E. (2006). Effect of P-selectin inhibition on leukocyte-endothelium interaction and survival after global cerebral ischemia. *J Neurology*, 253(3), 357-363.
80. Letechipia-Vallejo, G., Gonzalez-Burgos, I., y Cervantes, M. (2001). Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res*, 32(3), 186-192.
81. Letechipia-Vallejo, G., Lopez-Loeza, E., Espinoza-Gonzalez, V., Gonzalez-Burgos, I., Olvera-Cortes, M. E., Morali, G., y Cervantes, M. (2007). Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res*, 42(2), 139-146.
82. Letechipia-Vallejo, G., Morali, G., y Cervantes, M. (2004). Neuroprotección. Neuroprotectores endógenos. . *Temas selectos de neurociencias III. UAM*, 159-168.
83. Li, T. J., Qiu, Y., Mao, J. Q., Yang, P. Y., Rui, Y. C., y Chen, W. S. (2007). Protective effects of Guizhi-Fuling-Capsules on rat brain ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol Sci*, 105(1), 34-40.
84. Lin, X. J., Mei, G. P., Liu, J. A., Li, Y. L., Zuo, D., Liu, S. J., Lin, M. T. (2011). Therapeutic effects of melatonin on heatstroke-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res*, 50(4), 436-444.
85. Ling, X., Zhang, L. M., Lu, S. D., Li, X. J., y Sun, F. Y. (1999). Protective effect of melatonin on injured cerebral neurons is associated with bcl-2 protein over-expression. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 20(5), 409-414.
86. Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79(4), 1431-1568.
87. Liu, F. T., Hsu, D. K., Zuberi, R. I., Kuwabara, I., Chi, E. Y., y Henderson, W. R., Jr. (1995). Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*, 147(4), 1016-1028.
88. Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C., y Feuerstein, G. Z. (1994). Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25(7), 1481-1488.
89. Loane, D. J., y Byrnes, K. R. (2010). Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 7(4), 366-377.
90. Loddick, S. A., Turnbull, A. V., y Rothwell, N. J. (1998). Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(2), 176-179.
91. Maddahi, A., Kruse, L. S., Chen, Q. W., y Edvinsson, L. (2011). The role of tumor necrosis factor-alpha and TNF-alpha receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation*, 8, 107.

92. Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C., y Garnier, P. (2009). Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*, 4(12), e8101.
93. Magistretti, P. J., y Pellerin, L. (1999). Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1387), 1155-1163.
94. Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J., y Gonzalez-Gallego, J. (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*, 54, 1-14.
95. Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I., y Tan, D. X. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*, 53(4), 373-382.
96. Meybohm, P., Gruenewald, M., Zacharowski, K. D., Albrecht, M., Lucius, R., Fasel, N., Bein, B. (2010). Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care*, 14(1), R21.
97. Milot, M. R., y Plamondon, H. (2009). Time-dependent effects of global cerebral ischemia on anxiety, locomotion, and habituation in rats. *Behav Brain Res*, 200(1), 173-180.
98. Minami, M., Katayama, T., y Satoh, M. (2006). Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. *J Pharmacol Sci*, 100(5), 461-470.
99. Mitchell, R.N., Kumar, V., Abbas, A. K., y Fausto, N. (2007). *Compendio de Robbins y Cotran Patología estructural y funcional*.(Vol. 7), 3-29.
100. Morioka, T., Kalehua, A. N., y Streit, W. J. (1991). The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 11(6), 966-973.
101. Mun, C. H., Lee, W. T., Park, K. A., y Lee, J. E. (2010). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol*, 43(3), 230-240.
102. Nakayama, M., Uchimura, K., Zhu, R. L., Nagayama, T., Rose, M. E., Stetler, R. A., Graham, S. H. (1998). Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10954-10959.
103. Nakka, V. P., Gusain, A., Mehta, S. L., y Raghbir, R. (2008). Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol*, 37(1), 7-38.
104. Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M. E., y Iadecola, C. (1997). Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*, 17(8), 2746-2755.
105. Nowicka, D., Rogozinska, K., Aleksy, M., Witte, O. W., y Skangiel-Kramska, J. (2008). Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 68(2), 155-168.
106. OMS. (2008). The top 10 causes of death. Retrieved 20-05, 2013, from <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

107. Ooboshi, H., Ibayashi, S., Shichita, T., Kumai, Y., Takada, J., Ago, T., Iida, M. (2005). Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation*, 111(7), 913-919.
108. Opal, S. M., y DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-1172.
109. Osada, N., Kosuge, Y., Ishige, K., y Ito, Y. (2010). Characterization of neuronal and astroglial responses to ER stress in the hippocampal CA1 area in mice following transient forebrain ischemia. *Neurochem Int*, 57(1), 1-7.
110. Pantoni, L., Sarti, C., y Inzitari, D. (1998). Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(4), 503-513.
111. Pei, Z., y Cheung, R. T. (2004). Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res*, 37(2), 85-91.
112. Pei, Z., Fung, P. C., y Cheung, R. T. (2003). Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain barrier breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res*, 34(2), 110-118.
113. Pestka, S., Krause, C. D., y Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 202, 8-32.
114. Plamondon, H., Davignon, G., Khan, S., y Charron, C. (2008). Cerebral ischemic preconditioning induces lasting effects on CA1 neuronal survival, prevents memory impairments but not ischemia-induced hyperactivity. *Behav Brain Res*, 189(1), 145-151.
115. Plamondon, H., y Khan, S. (2005). Characterization of anxiety and habituation profile following global ischemia in rats. *Physiology & Behavior*, 84(4), 543-552.
116. Pradillo, J. (2008). *Medidores inflamatorios implicados en la tolerancia isquémica cerebral experimental*. (Memoria para optar al grado de Doctor), Universidad complutense de Madrid, Madrid.
117. Price, C. J., Warburton, E. A., y Menon, D. K. (2003). Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(11), 1476-1484.
118. Pulsinelli, W. A. (1995). The therapeutic window in ischemic brain injury. *Curr Opin Neurol*, 8(1), 3-5.
119. Pulsinelli, W. A., y Buchan, A. M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, 19(7), 913-914.
120. Rabinovich, G. A., y Rubinstein, N. (2001). [Galectins: a novel family of proteins involved in the regulation of the immune response. Implications in immunopathological processes]. *Medicina (B Aires)*, 61(1), 85-92.
121. Rabinovich, G. A., Rubinstein, N., y Fainboim, L. (2002). Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol*, 71(5), 741-752.
122. Reiter, R. J., Tan, D. X., Leon, J., Kilic, U., y Kilic, E. (2005). When melatonin gets on your nerves: Its beneficial actions in experimental models of stroke. *Experimental Biology and Medicine*, 230(2), 104-117.

123. Rennie, K., de Butte, M., Frehette, M., y Pappas, B. A. (2008). Chronic and acute melatonin effects in gerbil global forebrain ischemia: long-term neural and behavioral outcome. *J Pineal Res*, 44(2), 149-156.
124. Romano, M. (2011). Mecanismos inflamatorios involucrados en el daño cerebral isquémico agudo Posibles blancos terapéuticos Factores pronósticos. *Neurol Arg*, 3(3), 176-181.
125. Rosi, S. (2011). Neuroinflammation and the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Brain Behavior and Immunity*, 25, S39-S49.
126. Sacco, R. L., Wolf, P. A., y Gorelick, P. B. (1999). Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology*, 53(7 Suppl 4), S15-24.
127. Saito, K., Suyama, K., Nishida, K., Sei, Y., y Basile, A. S. (1996). Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Letters*, 206(2-3), 149-152.
128. Sánchez, N. (2008). Enfermedad Cerebro Vascular en México. Epidemiología y pronóstico. *Revista Ministerio de Salud*, 1-5.
129. Satoh, K., Niwa, M., Binh, N. H., Nakashima, M., Kobayashi, K., Takamatsu, M., y Hara, A. (2011). Increase of galectin-3 expression in microglia by hyperthermia in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia. *Neurosci Letters*, 504(3), 199-203.
130. Satoh, K., Niwa, M., Goda, W., Binh, N. H., Nakashima, M., Takamatsu, M., y Hara, A. (2011). Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Res*, 1382, 266-274.
131. Schleien, C. L., y Kuluz, J. W. (1996). The Role of Leukocytes in Global and Focal Brain Ischemia. Find out how to access preview-only content Intensive Care in Childhood. *Update in Intensive Care and Emergency Medicine*, 25, 175-186.
132. Sekeljic, V., Bataveljic, D., Stamenkovic, S., Ułamek, M., Jabłóński, M., Radenovic, L., Andjus, P. R. (2012). Cellular markers of neuroinflammation and neurogenesis after ischemic brain injury in the long-term survival rat model. *Brain Struct Funct*, 217, 411-420.
133. Selakovic, V., Janac, B., y Radenovic, L. (2010). MK-801 effect on regional cerebral oxidative stress rate induced by different duration of global ischemia in gerbils. *Mol Cell Biochem*, 342(1-2), 35-50.
134. Sharon, N., y Lis, H. (2004). History of lectins: from hemmagglutinins to biological recognition molecules *Glycobiology*, 14, 53-62.
135. Shi, D., Xiao, X., Wang, J., Liu, L., Chen, W., Fu, L., Deng, W. (2012). Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated CRL1999 cells via targeting MAPK, NF-kappaB, c/EBPbeta, and p300 signaling. *J Pineal Res*, 53(2), 154-165.
136. Shibata, M., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Kalaria, R. N., Fujita, Y., Ohtani, R., Tomimoto, H. (2007). Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, 38(10), 2826-2832.
137. Shin, T. (2013). The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review. *Acta Histochem*.

138. Shohami, E., Ginis, I., y Hallenbeck, J. M. (1999). Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10(2), 119-130.
139. Smith, C. J., Emsley, H. C., Gavin, C. M., Georgiou, R. F., Vail, A., Barberan, E. M., Tyrrell, P. J. (2004). Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*, 4, 2.
140. Sriram, K., y O'Callaghan, J. P. (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2(2), 140-153.
141. Stoll, G., Jander, S., y Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*, 56(2), 149-171.
142. Strle, K., Zhou, J. H., Shen, W. H., Broussard, S. R., Johnson, R. W., Freund, G. G., Kelley, K. W. (2001). Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*, 21(5), 427-449.
143. Suzuki, S., Tanaka, K., y Suzuki, N. (2009). Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(3), 464-479.
144. Sydserff, S. G., Cross, A. J., Murray, T. K., Jones, J. A., y Green, A. R. (2000). Clomethiazole is neuroprotective in models of global and focal cerebral ischemia when infused at doses producing clinically relevant plasma concentrations. *Brain Res*, 862(1-2), 59-62.
145. Tocharus, J., Khonthun, C., Chongthammakun, S., y Govitrapong, P. (2010). Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J Pineal Res*, 48(4), 347-352.
146. Tormo-Calandín, C. (2004). Papel de la neuroprotección. *Med Intensiva*, 28(3), 143-155.
147. Tremblay, M. E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., y Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*, 31(45), 16064-16069.
148. Tu, X. K., Yang, W. Z., Wang, C. H., Shi, S. S., Zhang, Y. L., Chen, C. M., Wen, S. (2010). Zileuton reduces inflammatory reaction and brain damage following permanent cerebral ischemia in rats. *Inflammation*, 33(5), 344-352.
149. Vane, J. R., y Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React*, 20(1), 3-15.
150. Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., y Chamorro, A. (2000). Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*, 31(10), 2325-2329.
151. Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., Esteve, A., Planas, A. M., y Chamorro, A. (2003). Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke*, 34(3), 671-675.
152. Walther, M., Kuklinski, S., Pesheva, P., Guntinas-Lichius, O., Angelov, D. N., Neiss, W. F., Probstmeier, R. (2000). Galectin-3 is upregulated in microglial cells in response to ischemic brain lesions, but not to facial nerve axotomy. *J Neurosci Res*, 61(4), 430-435.
153. Wang, D., y Corbett, D. (1990). Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Res*, 533(1), 78-82.

154. Wang, X., Yue, T. L., Barone, F. C., White, R. F., Gagnon, R. C., y Feuerstein, G. Z. (1994). Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol*, 23(2-3), 103-114.
155. Wang, X., Yue, T. L., Young, P. R., Barone, F. C., y Feuerstein, G. Z. (1995). Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(1), 166-171.
156. Webster, C. M., Kelly, S., Koike, M. A., Chock, V. Y., Giffard, R. G., y Yenari, M. A. (2009). Inflammation and NFkappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*, 33(2), 301-312.
157. Whitney, N. P., Eidem, T. M., Peng, H., Huang, Y., y Zheng, J. C. (2009). Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 108(6), 1343-1359.
158. Wijdicks, E. F., Campeau, N. G., y Miller, G. M. (2001). MR imaging in comatose survivors of cardiac resuscitation. *AJNR Am J Neuroradiol*, 22(8), 1561-1565.
159. Yamashita, K., Kataoka, Y., Sakurai-Yamashita, Y., Shigematsu, K., Himeno, A., Niwa, M., y Taniyama, K. (2000). Involvement of glial endothelin/nitric oxide in delayed neuronal death of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Cell Mol Neurobiol*, 20(5), 541-551.
160. Yan, Y. P., Lang, B. T., Vemuganti, R., y Dempsey, R. J. (2009). Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. *Brain Res*, 1288, 116-124.
161. Yasuda, Y., Shimoda, T., Uno, K., Tateishi, N., Furuya, S., Tsuchihashi, Y., Fujita, S. (2011). Temporal and sequential changes of glial cells and cytokine expression during neuronal degeneration after transient global ischemia in rats. *J Neuroinflammation*, 8, 70.
162. Yoshimoto, T., Houkin, K., Tada, M., y Abe, H. (1997). Induction of cytokines, chemokines and adhesion molecule mRNA in a rat forebrain reperfusion model. *Acta Neuropathol*, 93(2), 154-158.
163. Yrjanheikki, J., Keinanen, R., Pellikka, M., Hokfelt, T., y Koistinaho, J. (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26), 15769-15774.
164. Yu, L. G. (2010). Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis. *World J Gastrointest Oncol*, 2(4), 177-180.
165. Yu, L., Ruifrok, W. P., Meissner, M., Bos, E. M., van Goor, H., Sanjabi, B., de Boer, R. A. (2013). Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Heart Fail*, 6(1), 107-117.
166. Zalewska, T., Ziemka-Nalecz, M., Sarnowska, A., y Domanska-Janik, K. (2002). Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 62(2), 53-61.
167. Zhang, C. Y., Shen, W. H., y Zhang, G. Y. (2004). Ischemia-induced release of cytochrome c from mitochondria and up-regulation of Bcl-2 expression in rat hippocampus. *Sheng Li Xue Bao*, 56(2), 147-152.
168. Zhang, J. M., y An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45(2), 27-37.

169. Zhu, Y. Y., Saito, K., Murakami, Y., Asano, M., Iwakura, Y., y Seishima, M. (2006). Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Letters*, 393(2-3), 122-126.
170. Zuberi, R. I., Hsu, D. K., Kalayci, O., Chen, H. Y., Sheldon, H. K., Yu, L., Liu, F. T. (2004). Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol*, 165(6), 2045-2053.