



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

**Estudio del curso temporal de radicales libres
en un modelo experimental de isquemia
cerebral mediante la técnica RPE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN FÍSICA Y MATEMÁTICAS

PRESENTA

Sandybell Guadalupe Ferrer Jiménez

ASESOR: DR. DANIEL RAMÍREZ ROSALES
ASESORA EXTERNA: DRA. G. CLEVA VILLANUEVA



México, D. F.

DICIEMBRE 2008

Dedicatorias

Tras muchos años entendí que eres la persona que me ama tal y como soy sin condiciones ni fronteras; eres en mi vida lo más importante y así como algunas veces los recursos no te fueron suficientes para ofrecérmelos en este instante nada me satisface para expresar que estoy infinitamente agradecida por todo lo que me has dado.

Dedicado a mi Madre

En aquellos días y en el transcurrir del tiempo experimentamos travesuras, enojos, tristezas, rebeldías, caprichos, alegrías, dolor... y mucha añoranza en el corazón. Eso fue lo que vivieron cuatro personas totalmente diferentes. La vida tiene esas cosas que nos llena de angustias y alegrías. Algún día ellos... se transformaron en bases para una nueva familia, entonces mi vida fluctuó precipitadamente hasta que comprendes y dices: No te quiero para mi, ni siquiera te quiero para nada, sólo me gusta ser un observador de tu ser: ¡que dicha que existas!. Independientemente de mi y más allá de mi.

Dedicado a mis Hermanos

La vida misma nos da a elegir caminos:
en la fase del miedo y del triunfo,
en las fuerzas de resistencia que coexisten.
En la línea divisora,
de la imaginación para crearlo y realizarlo
y la realidad de lograrlo.

El amor con el cual se mantiene la esperanza,
para alcanzar los movimientos que darán continuidad:

Al flexionar nuestro cuerpo y mente,
ha de entregarse la nobleza y el espíritu...
para formar así un círculo lleno de entrega.

Por el amor a mi sangre
Por el amor a la danza hoy en un presente
Y para toda una vida.

Agradecimientos

A mi familia que me apoyó anímica, moral, material y económicamente durante todos estos años.

A mi madre y padre: por la aceptación incondicional y el apoyo mutuo que hemos conquistado.

A mis hermanos Enrique, Miguel y Patricia: por ser y estar, por compartir el espacio y los momentos significativos.

A mis sobrinos Karla, Eduardo, Fernando, Fátima y Lizbeth por aquellos grandes momentos que pasamos de risas que echo muchísimo de menos y que la nueva familia puede otorgarte.

A la ESFM y a mis profesores por la formación académica.

A la Dra. Guadalupe Cleva Villanueva y al Dr. Daniel Ramírez Rosales por la dirección de este trabajo.

A mis sinodales, por las sugerencias para el mejoramiento de esta tesis.

A los profesores que dejaron en mi una huella imborrable e única: Lic. Germán Arriaga Mejía, Dr. Arturo Zuñiga Segundo, M. en C. Modesto Cárdenas García, Dr. Fernando Ángulo Brown, Dr. Jaime Avendaño López y el Dr. Rafael Zamorano Ulloa. También a mis jefes de servicio social por su apoyo y enseñanza: Lic. Mario Chavarría Castañeda y Lic. Germán Arriaga Mejía.

A mis compañeros y amigos de ESFM: Hugo, Julián, Mike, Luis, Citlalitl y Adriana que conocí en la carrera, conocerlos ha sido una de las mejores cosas que me han pasado en la vida, gracias por aparecer y confrontarme, por enseñarme y aprender conmigo.

A Cary por ser incondicionalmente mi mejor amiga.

A Luis H. L. M. por su apoyo y amor incondicional que me demostró en la vida.

Al maestro Enrique Santillán y Don Ricardo García por haberlos conocido, ello conllevó a mi descubrimiento más valioso e importante en mi vida: la búsqueda.

A Mabel, Angela, Gerardo, Manuel y Enrique por ser los mejores amigos que tengo dentro de la danza, por sus consejos y apoyo.

A Ivan J. G. que compartimos un montón de cosas, ¿sería el destino que nos encontramos?.

A todas aquellas personas que participaron directa e indirectamente en mi enseñanza de la vida.

*¿Cuix nomelahuacatemic cemani ixquich tlamantli?
ocalactia in teoyelitztli amo
tlamatoquilitztli in yuhquizalitztli
ahzo moztla huallaz,
ahnozo ahzo ayc.*

Ferrer J. S.
Traducido por García G. I

Índice general

Índice de abreviaturas	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	VIII
Introducción	1
1. Antecedentes	4
1.1. Cambios metabólicos durante la Isquemia Cerebral	4
1.2. Fisiopatología de la Isquemia Cerebral	6
1.3. Tratamiento actual	8
2. Justificación	9
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos particulares	11
4. Metodología	12
4.1. Protocolo de Isquemia Cerebral	12
4.2. Obtención de muestras para RPE	13
4.2.1. Animales	13
4.2.2. Modelo de Isquemia Cerebral	13
4.2.3. Valoración neurofisiológica	15
4.2.4. Obtención de muestras para RPE y pruebas bioquímicas	15
4.3. RPE en sistemas biológicos	16

4.3.1. Espectrómetro de RPE	17
4.3.2. Detección experimental	17
4.4. Análisis estadístico	18
5. Resultados y discusión	19
5.1. Espectros RPE del grupo control	20
5.1.1. Tejido cerebral	20
5.1.2. Plasma	23
5.2. Espectros RPE de los grupos sometidos a IC	25
5.2.1. Tejido cerebral	25
5.2.2. Plasma	26
5.3. Análisis Cuantitativo	27
5.4. Evaluación neurofisiológica	30
5.5. Análisis de pruebas bioquímicas	32
5.5.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	32
5.5.2. Malondialdehido (MDA)	34
5.5.3. Correlación de SOD y MAD con RL.	35
5.5.4. Carbonilo	37
5.6. Discusión de volúmenes	39
6. Conclusiones	42
A. Teoría de RPE	44
A.1. Principio básico de RPE	44
A.2. Hamiltoniano de espín	46
A.3. Término Zeeman electrónico	47
A.4. Término de interacción hiperfina	48
A.5. Término de campo cristalino	50
B. Modelo matemático para el cálculo de volúmenes	54
B.1. Introducción	54
B.2. Metodología	55
B.3. Fundamentación	55
B.3.1. Aproximación a la función	56
B.4. Resultados	59
B.5. Conclusiones	61
C. Curso temporal de espectros RPE	62

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	III
D. Glosario	68
Bibliografía	71

Índice de abreviaturas

AO	Antioxidante(s)
ACI	Accidente cerebrovascular isquémico
AGA	Aterosclerosis de grandes arterias
AIT	Accidente isquémico transitorio
AVC	Accidente(s) vascular(es) cerebral(es)
CIR	Cirugía
ECV	Enfermedad(es) cerebro vascular(es)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético sal disódico dihidrato
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
IC	Isquemia cerebral
ICT	Isquemia cerebral transitoria
KABSS	Ketamina Acepromazina Butorfanol Solución Salina
OACM	Oclusión de la Arteria Cerebral Media
RL	Radical(es) libre(s)
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
SNC	Sistema Nervioso Central

Índice de figuras

1.1. AVC e IC: obstrucción del FSC por una embolia (a) y un trombo (c).	5
1.2. Fisiopatología de la IC.	7
4.1. Protocolo de Isquemia Cerebral.	13
4.2. Modelo de Isquemia Cerebral.	15
4.3. Obtención de muestras.	16
5.1. Espectro RPE mostrando un radical libre.	19
5.2. Espectro RPE del grupo control de tejido cerebral.	20
5.3. Estructura del grupo hemo	21
5.4. Simulación del NO-Fe ²⁺	22
5.5. Espectro RPE de plasma del grupo control a ventana cerrada.	23
5.6. Espectro RPE de plasma del grupo control a ventana abierta.	24
5.7. Espectro RPE de la ZI a las 8 hrs. después de la IC	25
5.8. Gráfico comparativo de intensidades para las señales A y C.	27
5.9. Gráfico comparativo del cociente H _R /H _L	28
5.10. Gráfico de intensidades relativas para las señales D,E,F y J.	29
5.11. Gráfico de la evaluación neurofisiológica.	30
5.12. Gráfico que muestra la correlación de la EN y H _R /H _L	31
5.13. Las correspondientes gráficas presentan los niveles de SOD en ambos hemisferios (HL y HR) en el transcurso temporal de la IC.	32
5.14. Cantidad relativa de RL y niveles de SOD graficados con el objetivo de observar ambos comportamientos de uno respecto del otro en el transcurso temporal de la IC.	33
5.15. Penumbra isquémica a las 8 hrs.	33
5.16. Niveles de MDA para las muestras correspondientes a HL y HR con p<0,05 (ANOVA dos vías). Esto quiere decir que hay diferencia significativa de los niveles de MDA entre ambos hemisferios.	34

5.17. Valores del área bajo la curva de la señal A ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$) para HL, HR y ZI. Los valores obtenidos posteriores a la IC son menores al valor basal. Hay diferencia significativa : $p < 0,001$ (ANOVA una vía) y $p < 0,01$ comparando los grupos (Tukey).	35
5.18. Valores del área bajo la curva de la señal C (RL proveniente de electrones) para HL, HR y ZI. Los valores obtenidos posteriores a la IC son mayores al valor basal.	36
5.19. Contenido de carbonilo para los hemisferios HL y HR, $p > 0,05$ (dos vías ANOVA) lo que indica que no hubo cambios en el curso temporal y que no existe diferencia del contenido de carbonilo entre ambos hemisferios.	37
5.20. Transcurso temporal del volumen de hemisferio contralateral, isquémico y de la zona isquémica subsiguiente a la IC.	39
5.21. Transcurso temporal de los valores de porcentaje de infarto y edema. El valor negativo del porcentaje de edema es consecuencia de que $\text{VOL.HR} < \text{VOL.HL}$	40
5.22. Gráfica que muestra el transcurso temporal tanto de la cantidad relativa de RL y centros paramagnéticos con el volumen del hemisferio isquémico.	41
5.23. Gráfica que muestra el transcurso temporal tanto de la cantidad relativa de RL y centros paramagnéticos con el porcentaje de infarto.	41
A.1. Desdoblamiento Zeeman de un sistema $S=1/2$	46
A.2. Interacción dipolar magnética entre $\mu_S(\mu_e)$ y $\mu_N(\mu_I)$	48
A.3. Parte angular de las funciones de onda (orbitales) de un electrón 3d.	50
A.4. El efecto del campo cristalino sobre los niveles de energía de los orbitales d: a) ion metálico libre simetría esférica, b) geometría octaédrica, c) octaédro con distorsión.	52
B.1. Esquema de las formas aproximadas.	57
B.2. La sección determinada por el sistema (B.8), a partir de las líneas rojas hasta el frente.	58
B.3. Función propuesta para la ZI.	60
C.1. Curso temporal de los espectros RPE para el HL.	63
C.2. Curso temporal de los espectros RPE para el HR.	64
C.3. Curso temporal de los espectros RPE para la ZI.	65
C.4. Curso temporal de los espectros RPE para ventana cerrada.	66

C.5. Curso temporal de los espectros RPE para plasma ventana abierta. . 67

Índice de Tablas

4.1. Características de los grupos utilizados en el modelo experimental de IC.	14
5.1. Características de las señales del grupo control correspondientes a tejido.	20
5.2. Características de las señales del grupo control correspondientes a plasma.	23
5.3. Características de las señales A y C para la ZI.	25
5.4. Características de las señales A y C después de la IC.	26
5.5. Valores de H_R/H_L e infarto.	28
A.1. Valores posibles de espín en complejos Fe^{2+} y Fe^{3+}	53
B.1. Funciones propuestas para la determinación de los volúmenes.	60

Introducción

Por ser la física la ciencia que estudia los fenómenos que ocurren en la naturaleza, puede aplicarse en otros campos de estudio tales como la química, la aeronáutica, la nanotecnología, etc. Una de las aplicaciones de interés actual es la física aplicada a sistemas biológicos, en donde se proporciona una solución alternativa a la medicina para entender ciertas entidades patológicas del hombre.

Es extremadamente importante entender el funcionamiento del cuerpo humano, de esta forma podremos saber cuándo no está funcionando adecuadamente, por qué, y en el mejor de los casos podremos saber cómo corregir el daño [1]. Para ello la medicina se ha introducido en los fenómenos de oxidación celular, dando a éstos una interpretación desde un punto de vista físico. Esta incursión de la medicina en la física, ha tenido un gran impacto en los últimos años; ya que ha generado conocimiento, por ejemplo, de los radicales libres (RL) y la influencia de éstos en enfermedades humanas [2].

Nuestro cuerpo constantemente reacciona con el oxígeno (O_2) como parte de los procesos de producción de energía de las células [3]. Un RL es una molécula paramagnética de corta vida, la cual contiene uno o más electrones desapareados en un orbital en donde debería haber un par de electrones con idénticos números cuánticos, excepto por los espines opuestos; esto la hace una molécula muy reactiva [3, 4].

Los RL se producen en el cuerpo humano como consecuencia del metabolismo normal, pero pueden aumentar ante diversos estímulos como: la contaminación atmosférica, el tabaquismo, un ejercicio intenso o una exposición prolongada al sol. Los RL atacan las moléculas estables tratando de “robarles” un electrón para recuperar su estabilidad electroquímica dejándola oxidada. Este tipo de moléculas producen alteraciones en los componentes bioquímicos de las células que pueden desencadenar estados patológicos. De manera natural, el organismo produce sustancias (antioxidantes) que contrarrestan los efectos de los RL que se producen fisiológicamente.

Es decir, los antioxidantes (AO) ayudan a mantener el equilibrio entre los estados oxidado y reducido de las células. La respuesta del organismo sano ante el aumento de la producción excesiva de RL es la elevación de la defensa antioxidante (AO). Cuando dicho equilibrio se pierde a favor de los RL se dice que la célula se encuentra en estrés oxidativo [4, 5, 6, 7]. La salud de las personas tiene entonces un vínculo con el adecuado balance oxidativo, es decir, que RL y AO se equilibren tal que se minimice el daño y retarde la aparición de enfermedades [8, 9].

El gran número de entidades patológicas en las cuales se hallan involucrados los RL, ha motivado el interés en el desarrollo de técnicas de mayor sensibilidad y selectividad para determinar los niveles de oxidantes, antioxidantes y el daño oxidativo en seres humanos. La espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE), es una técnica física utilizada para detectar directamente la cantidad relativa de RL y especies paramagnéticas presentes en muestras que tengan al menos un electrón desapareado, por ejemplo: muestras biológicas. Por su carácter no destructivo y su alta versatilidad es un complemento valioso de otros métodos de análisis, permitiendo obtener una invaluable información estructural y dinámica.

Mediante la técnica de RPE sólo se detectan átomos y moléculas con electrones desapareados; esto parece ser una limitante, sin embargo es una gran ventaja [10, 11]. Sus aplicaciones son muy numerosas y se extienden a diversos campos de investigación como la química, física, biología, geología y medicina; por ejemplo de esta última pueden estudiarse enfermedades degenerativas o sistémicas. En el caso específico del presente trabajo enfocaremos nuestra atención en el estudio del curso temporal de la producción de RL en un modelo experimental de *isquemia cerebral*.

En el cerebro las neuronas no poseen capacidad de regeneración y además deben de efectuar numerosas funciones con gran celeridad. Así pues, su correcto funcionamiento exige un suministro constante de nutrientes, principalmente oxígeno y glucosa.

Las células cerebrales mueren en escasos minutos cuando dejan de recibir oxígeno y nutrientes de la sangre o cuando son dañadas por una hemorragia repentina en el cerebro a alrededor del mismo. Cuando los accidentes vasculares cerebrales (AVC) son hemorragias: la sangre se esparce y daña al tejido adyacente. Por ello, los AVC son muy peligrosos, éstos últimos aparecen sin previo aviso[12].

Isquemia cerebral (IC) es el término utilizado para describir la pérdida de oxígeno y nutrientes en las células cerebrales cuando no existe un flujo adecuado de sangre.

El deterioro del flujo cerebral puede ser causado por muchos trastornos y los más importantes pueden ser considerados bajo los títulos siguientes [13]:

- *Enfermedades que producen alteración de la presión arterial* como: hipotensión postural severa, estado de choque físico o psicológico (para las cuales la presión arterial debe de disminuir considerablemente para que se reduzca el flujo sanguíneo cerebral) y el cambio de la viscosidad sanguínea (policitemia vera).
- *Enfermedades de las paredes arteriales*, la causa más frecuente de estrechamiento de la luz de las arterias que irrigan al encéfalo es el ateroma.
- *Enfermedades que causan obstrucción de la luz arterial*, la embolia de una arteria cerebral puede ocurrir de dos formas: un trombo (la forma más frecuente) y glóbulos de grasa.

El 80-88 % de los casos, los AVC son de tipo isquémico. También hay AVC hemorrágico (9%) [12, 14].

Capítulo 1

Antecedentes

En sujetos con enfermedad aterosclerótica de las arterias carótidas es frecuente que se presente el ataque de isquemia cerebral transitoria (ICT), el cual es un complejo sindromático que alerta de un futuro ataque cerebral. Dado el alto riesgo de desarrollar IC en las horas o días que siguen a la ICT, éste debe considerarse como una urgencia neurológica [15].

La evaluación de los factores de riesgo específicos de los diferentes subtipos clínicos de pacientes, puede contribuir a una mejor y más eficaz prevención de los AVC isquémicos. Las tasas de AVC recurrentes debidos a la aterosclerosis de grandes arterias (AGA) son mayores que las observadas en otros subtipos clínicos [16].

Algunos factores de riesgo y síntomas clínicos están asociados con determinados subtipos etiológicos de los accidentes isquémicos transitorios (AIT), pero aún se requieren factores más eficientes de predicción de los AVC recurrentes para identificar a los pacientes con mayor riesgo según los diferentes subtipos clínicos de los AIT [17].

1.1. Cambios metabólicos durante la Isquemia Cerebral

Un accidente cerebrovascular isquémico (ACI) ocurre cuando una arteria que suministra sangre al cerebro queda bloqueada reduciendo repentinamente o interrumpiendo el flujo de sangre y con el tiempo ocasionando un infarto. La muerte de células cerebrales que con el tiempo son sustituidas por una cavidad llena de fluido en el cerebro lesionado [18].

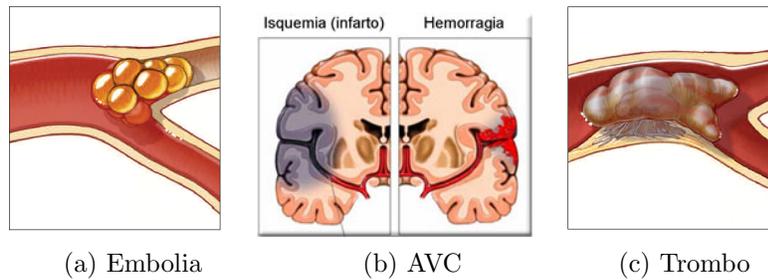


Figura 1.1: AVC e IC: obstrucción del FSC por una embolia (a) y un trombo (c).

Los coágulos de sangre son la causa más común de bloqueo arterial y de infarto cerebral (fig. 1.1) [19]. La IC puede producirse por diferentes causas que disminuyan el flujo sanguíneo cerebral (FSC) por debajo de un nivel crítico desde 55 ml/100g/min hasta menos de 12 ml/100g/min.

Esta interrupción o disminución de FSC en un territorio vascular determinado genera un área de infarto circundada de otra zona [20, 21]. La obstrucción de un vaso sanguíneo cerebral ocasiona un gradiente de flujo de sangre en el territorio vascular afectado que da lugar a una zona central severamente hipoperfundida (núcleo isquémico). En tanto que la periferia se establece una isquemia menos pronunciada (penumbra isquémica). La región de penumbra isquémica, donde el flujo residual es inferior al flujo normal e insuficiente para el mantenimiento de la función celular, permanece viable debido a la eficacia de la circulación colateral. En el núcleo isquémico, con un flujo inferior al umbral del infarto, se produce muerte celular aguda, principalmente por necrosis [18].

La presencia de la zona de penumbra en la isquemia aguda en animales y humanos se ha establecido por varios estudios de tomografía por emisión de positrones y de imágenes de resonancia magnética nuclear. En la penumbra la función neuronal eléctrica está abolida, pero conserva una actividad metabólica mínima que preserva su integridad estructural durante algún tiempo, hasta que la producción de adenosintrifosfato (ATP) cae por debajo del 50% de los niveles normales. Se ha sugerido que la muerte de la zona de penumbra tiene características de apoptosis en lugar de necrosis [22]. Lógicamente el periodo de tiempo durante el cual la penumbra persiste, representa una oportunidad potencial terapéutica [18, 23]. La viabilidad de las células en la zona de penumbra tiene un tiempo limitado, ya que la disminución de las reservas de oxígeno y glucosa desencadena diversos procesos patológicos que puede conducir a la muerte celular [24].

Por lo tanto, la zona de penumbra constituye el blanco principal para la mayoría de las intervenciones clínicas agudas aplicadas entre las 3 y 6 horas post-ictal [25]. No todas las neuronas, responden de forma semejante al daño isquémico. Por ejemplo, en la corteza cerebral las neuronas son más sensibles a la isquemia y sufren cambios estructurales más rápido que las neuronas de otras localizaciones.

1.2. Fisiopatología de la Isquemia Cerebral

Al producirse la cascada de procesos durante la isquemia empiezan los síntomas clínicos que caracterizan a la enfermedad cerebrovascular [20, 21]. Por un lado, en el daño isquémico especialmente en la zona de penumbra hay una sobre activación de receptores de glutamato, la acumulación intracelular de iones calcio, el aumento de células inflamadas, la producción de radicales libres y procesos patológicos que conllevan a la apoptosis [26, 27].

La inflamación ha sido implicada como fuente del daño secundario después de la isquemia. Tras el episodio de la isquemia/reperfusión, el endotelio vascular promueve inflamación a través de la liberación de citoquinas y la aparición de moléculas que permiten la adhesión y migración de los leucocitos circulantes dentro del sistema nervioso central (SNC). Tan sólo una hora después del inicio de la oclusión ya se puede observar la diapédesis de leucocitos polimorfonucleares en el núcleo isquémico [28]. La inflamación se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio y está generada por los agentes inflamatorios. El mayor problema que surge de la inflamación, es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos. La adhesión de leucocitos al endotelio, así como el depósito de fibrina en la luz vascular debido a la generación intravascular de trombina [29, 30], contribuyen a la obstrucción microvascular (fig. 1.2).

Un modulador importante de lesión de la IC es el edema cerebral, el cual puede ser diferenciado en dos fases: el citotóxico, que se produce inmediatamente después de la IC y el vasogénico o edema tardío [31]. El tipo citotóxico tiene un umbral dependiente del FSC, el cual empieza con valores de flujo del 30 %. La alteración de la función mitocondrial aumenta el metabolismo anaeróbico, lo que a su vez aumenta la osmolaridad del tejido cerebral y lo que incrementa la entrada de agua a la célula.

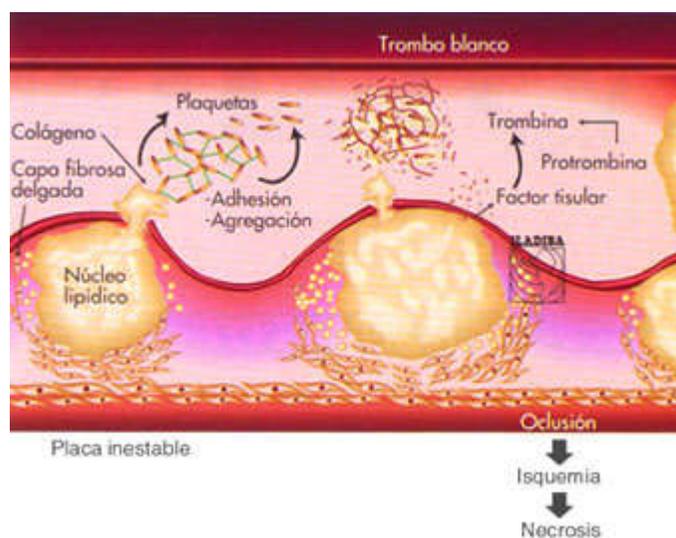


Figura 1.2: Fisiopatología de la IC.

A valores del flujo por debajo del 20 % (anoxia), se produce despolarización debida a la entrada de iones positivos a través de la membrana, conjuntamente con agua [32]. Con la manifestación de necrosis del tejido se produce el paso de las proteínas séricas del plasma al líquido intersticial. Con esta perturbación comienza el edema tipo vasogénico.

La deficiencia progresiva de oxígeno entre 40 y 75 % del flujo normal da lugar al tránsito paulatino hacia la anaerobiosis, que se expresa con un aumento de la tasa metabólica cerebral para la glucosa y de la concentración de ácido láctico. La despolarización de la membrana conlleva liberación de glutamato y entrada de calcio con acidificación del sistema entre el 30 y el 45 %. A valores inferiores de flujo sanguíneo, entre 10 y 35 %¹, el metabolismo energético se hace menor haciendo que la célula sea incapaz de controlar el potasio intracelular. Por debajo de estos niveles el daño es irreversible [23].

El daño por isquemia en un punto determinado del cerebro depende no solo de las arterias que irrigan una determinada zona; sino también del flujo sanguíneo en un momento determinado. Las lesiones vasculares del encéfalo son extremadamente frecuentes y el defecto neurológico resultante depende del tamaño de la arteria ocluida, del estado de la circulación colateral y del área de encéfalo afectada [13].

¹Estos valores fueron determinados con bastante precisión en modelos experimentales y son semejantes en diferentes especies de mamíferos, incluido el hombre, durante las primeras horas del daño.

1.3. Tratamiento actual

El éxito del tratamiento de los AVC agudos es todavía limitado. Sin embargo, la mortalidad ha disminuido significativamente cuando se cuenta con los recursos disponibles en la actualidad.

Los objetivos del tratamiento incluyen tanto la estabilización del paciente como la prevención de nuevas lesiones cerebrales mediante la perfusión cerebral isquémica para mejora de los tejidos . El tratamiento debe de incluir apoyo médico. Es de máxima importancia mantener la vía aérea permeable en caso de que el paciente sufra pérdida de consciencia. Así también es necesario estabilizar tanto la presión sanguínea como el ritmo cardíaco. El siguiente paso en el protocolo se basa en determinar si el AVC es de tipo hemorrágico o trombótico. Por lo tanto, una tomografía computarizada (TC) debe de ser obtenida tan pronto sea posible.

El tratamiento médico debe de incluir algún antagonista β_1 adrenérgico para reducir el trabajo cardíaco manteniendo la presión sanguínea. Dado que se ha demostrado que la fiebre y la hiperglucemia son perjudiciales para la recuperación, la regulación en la glucosa y la temperatura del cuerpo son importantes. Los niveles de glucosa deben de ser inferiores a 200/mg/dl.

Dentro del tratamiento farmacológico de la apoplejía encefálica isquémica aguda, existen múltiples tratamientos neuroprotectores en el momento actual pero no vamos a revisarlos. Sólo se listan los siguientes: agentes trombolíticos, anticoagulantes, anti-agregantes plaquetarios, agentes neuroprotectores, barredores de RL e inhibidores de la adhesión leucocitaria.

Capítulo 2

Justificación

Entre las enfermedades neurológicas más frecuentes en el mundo se encuentran las enfermedades cerebrovasculares (ECV), las cuales representan la tercera causa de mortalidad en los países occidentales; por lo que constituyen en la actualidad un problema de salud y una alta demanda médica [12, 23, 33]. La mortalidad por estas enfermedades se incrementa exponencialmente con la edad, duplicándose cada 5 años [21].

Las investigaciones que se hacen actualmente a nivel mundial de las ECV, siguen dos direcciones fundamentales: una dirigida al conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades y otra que se orienta al desarrollo de agentes y procedimientos terapéuticos para disminuir los índices de mortalidad y de discapacidad. En ambas direcciones, el aporte conferido por los modelos de IC en animales han contribuido al conocimiento de la fisiopatología [24, 34].

En la rata, la oclusión de una carótida, seguida de la oclusión de la arteria cerebral media produce isquemia cerebral. Este modelo reproduce el accidente vascular más frecuente en la clínica [24, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41]. En la actualidad, se tiene conocimiento de que se han desarrollado técnicas (como: el escáner, tomografía por emisión de positrones e imágenes por resonancia magnética nuclear) y estrategias neuroprotectoras (entre los que se encuentran los atrapadores de RL) [12, 42]. Sin embargo, el conocimiento acerca de la fisiopatología de la IC, su modelación en animales y la búsqueda de nuevos medicamentos que pudieran mejorar e incluso prevenir el daño al tejido isquémico es una fuente inagotable de preguntas para las investigaciones.

Es conocido que la excesiva producción de RL conduce al daño celular en una variedad de enfermedades, tal como la IC. Se ha mostrado que el uso de AO probados en modelos de IC focal como tratamiento en AVC son benéficos. Pero, ¿que tan cierto es esto? , ¿ bajo que condiciones se deberían de proponer tratamientos a pacientes con IC si éstos son patológicamente diferentes?.

Aunque los RL pueden ser directamente detectados en el tejido cerebral, su muy baja concentración y corta vida hace difícil su medición. La técnica RPE es la única que detecta de manera directa RL y es en extremo muy sensible, ésta debe de ser considerada si se desea conocer el papel que juega el estrés oxidativo en la IC [43].

En el caso específico del presente trabajo enfocamos nuestra atención en el estudio del curso temporal de la producción de RL en un modelo experimental de IC, con el fin de observar el papel de éstos y su cantidad relativa presente en dicha patología. Este tipo de estudio no existe reportado en la literatura.

Los resultados obtenidos mediante RPE, son un complemento muy importante para la parte médica y química, ya que una vez entendido el papel de los RL en la IC éstos podrían proponer el uso o no de AO como tratamiento en las enfermedades cerebrovasculares bajo ciertos criterios.

Por último, cabe mencionar que en medicina se evalúa el daño oxidativo y la defensa antioxidante mediante pruebas bioquímicas tales como la determinación de los niveles de superóxido dismutasa, malondialdehído y cantidad de carbonilo. En complemento al estudio RPE, éstas fueron consideradas para comparar y reforzar los resultados obtenidos mediante RPE.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo general

- Estudiar el curso temporal de la producción de RL y de especies paramagnéticas en tejido cerebral y plasma obtenidos de ratas sometidas a un modelo experimental de IC, mediante la técnica RPE y pruebas bioquímicas.

3.2. Objetivos particulares

- Inducir IC mediante la oclusión de la arteria carótida común derecha seguida de la cauterización de la arteria cerebral media.
- Obtener muestras de tejido cerebral y plasma.
- Estudiar mediante RPE las muestras de tejido cerebral y plasma.
- Efectuar pruebas bioquímicas de tejido cerebral: superóxido dismutasa, malondialdehído y carbonilo, como medida de la defensa antioxidante, del efecto de los RL en los lípidos y en las proteínas respectivamente.
- Identificar en la medida de lo posible, las especies paramagnéticas y los RL presentes en el curso temporal de IC.
- Relacionar los resultados RPE con: la evaluación neurofisiológica, resultados de pruebas bioquímicas, volúmenes de infarto, isquémico y contralateral.

Capítulo 4

Metodología

Para llevar a cabo los objetivos planteados previamente; en el presente trabajo se estableció el procedimiento ético para la experimentación *in vivo* con animales. La IC focal se indujo por el método de oclusión de la arteria cerebral media (OACM) en ratas macho Wistar de 10-14 semanas de edad [44].

4.1. Protocolo de Isquemia Cerebral

En seguida se presenta la descripción del protocolo de IC [45].

Previamente a la intervención quirúrgica de cada rata se midió el peso en g y glucosa en mg/dl. Se suministró una dosis de anestesia de 0,2 a 0,25 ml/100 g, ésta se preparó con ketamina, acepromazina, butorfanol y solución salina (KABSS)¹ con un mantenimiento de 0,05 a 0,1 ml vía intraperitoneal.

Dado el efecto de la anestesia colocamos el animal en decúbito dorsal, levantando con las manos la piel laxa, se efectuó una incisión con la tijera en la línea media de la cara anterior del cuello de aproximadamente 2,5 cm a partir de la horquilla esternal. Para encontrar el paquete vasculonervioso derecho, se usó el microscopio quirúrgico. Localizada la arteria carótida común derecha se ligó con hilo de seda quirúrgico de aproximadamente 5 cm (al ligar), se recortó el innecesario (al terminar de ocluir). Para finalizar este primer procedimiento, se hizo una sutura utilizando aguja e hilo de seda quirúrgico.

¹Cantidad de la dosis total=4,4 ml con la preparación de K=2 ml, A=800 μ l, B=1 ml y SS=600 μ l.

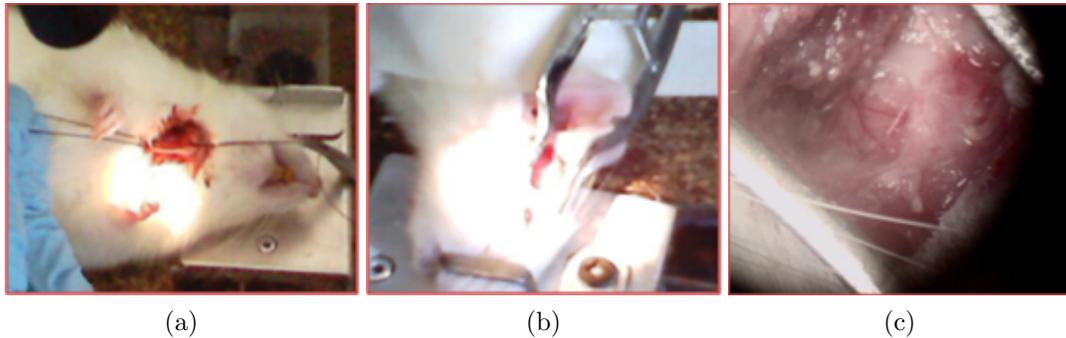


Figura 4.1: Protocolo de Isquemia Cerebral.

(a) Oclusión de la arteria carótida común, (b) procedimiento para la cauterización, (c) localización de la arteria cerebral media.

Posteriormente, se colocó a la rata sobre una pequeña camilla de madera en decúbito lateral izquierdo, la cual contiene un accesorio en forma de U invertida, con ella la parte de la boca fué inmobilizada y sus extremidades con cinta adhesiva. Con un bisturí se hizo una incisión entre la comisura del ojo y el conducto auditivo externo, para visualizar la zona de interés se utilizaron separadores autoestáticos. Se efectuó una trepanación en el hueso parietal derecho mediante un taladro quirúrgico y con el microscopio quirúrgico se localizó la arteria cerebral media la cual fue cauterizada con un electrocauterio quirúrgico. Al terminar se suturó (fig. 4.1).

4.2. Obtención de muestras para RPE

4.2.1. Animales

Veintidós ratas macho Wistar de 10-14 semanas de edad con 336 ± 23 g de peso fueron utilizadas para este estudio, de las cuales, 4 constituyen el grupo control para valores basales de las variables medidas.

4.2.2. Modelo de Isquemia Cerebral

Los animales se dividieron en 5 grupos (con $n=4$ cada uno), asociados a 0, 1, 4, 8 y 16 horas con IC. Posteriormente a la inducción de la IC, se efectuó una evaluación neurofisiológica a cada animal[45, 46]. Después se les administró una dosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal, dado su efecto anestésico se llevó a cabo la cateterización para la extracción de sangre.

Tabla 4.1: Características de los grupos utilizados en el modelo experimental de IC.

Tiempo [hrs]	Glucosa [mg/dl]	Peso [g] a. CIR.	KABSS [ml](IC)	Peso [g] d.CIR.	PS [μ l] (cateterización)
0	69 \pm 12	361 \pm 20	-	-	260 \pm 13
1	94 \pm 15	335 \pm 19	838 \pm 20	-	209 \pm 40
4	95 \pm 41	319 \pm 14	708 \pm 15	287 \pm 72	208 \pm 53
8	114 \pm 24	317 \pm 27	673 \pm 68	310 \pm 32	225 \pm 23
16	128 \pm 50	346 \pm 30	935 \pm 56	332 \pm 32	183 \pm 20

Finalmente los animales fueron sacrificados con una guillotina obteniendo de ello la cabeza e inmediatamente la extracción del cerebro con el uso de una gubia. Por otra parte, cabe hacer incapié que todos los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento antes y después de la cirugía.

La tabla 4.1 muestra las características de los grupos utilizados para el protocolo y modelo experimental de IC.²

El cerebro extraído fué rebanado en un molde (matriz cerebral), al haber colocado navajas cada 2 mm en las subdivisiones (de 1 mm) contenidas en dos partes laterales de éste. Al final se colocó toda la muestra a una temperatura de -26 ± 1 °C. Por otra parte, se preparó 30-45 ml de buffer (amortiguador de fosfato salino) con pH 7,4 al punto 1 molar (PBS) con 1 % de cloruro de triteniltretrazolio. La mezcla se agitó en un vortex Mixer y se mantuvo protegido de la luz hasta su uso.

La mezcla en baño María a $37,5\pm 6,2$ °C durante 5-15 minutos servida en una placa en la que las rebanadas obtenidas del cerebro fueron colocadas, pigmentó de color rojo la parte del tejido vivo y en blanco el muerto [47, 48]. Después de la pigmentación, las rebanas de cerebro fueron colocadas en papel milimétrico para ser fotografiadas (en su lado anverso y reverso). Lo que sirvió para calcular los volúmenes de infarto, isquémico y contralateral.

²La incertidumbre expandida U_p proporciona un intervalo $\mu_z \pm U_p$ que tiene aproximadamente un nivel de confianza $p=95\%$ de la distribución para $k_p=2,3$ y μ_z es la esperanza de una magnitud z . Para la obtención de la incertidumbre expandida se consideraron: la incertidumbre asociada a la esperanza de la muestra (tipo A) y la de resolución (tipo B) obteniendo de estas últimas la incertidumbre combinada, para más detalles consúltese [47, 48].

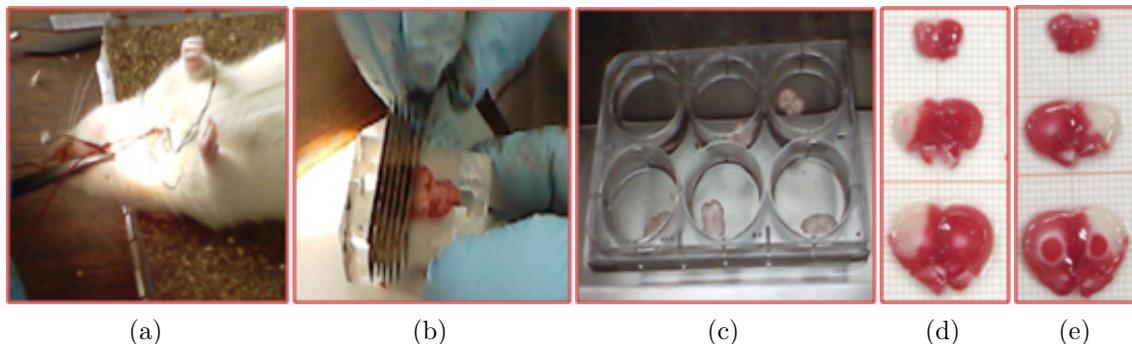


Figura 4.2: Modelo de Isquemia Cerebral.

(a) Extracción de sangre , (b) corte de cerebro, (c) rebanadas de cerebro en baño María a $37,5 \pm 6,2$ °C, rebanadas de cerebro pigmentadas (rojo: tejido vivo y blanco tejido muerto) después de 8 hrs. producida la IC ;(d) reverso y (e) anverso.

4.2.3. Valoración neurofisiológica

Antes de sacrificar al animal, un criterio neurológico fue hecho por dos observadores independientes. Los animales fueron evaluados por lo siguiente [45]:

- 0 Pts Sin déficit neurológico.
- 1-4 Pts Le falta extender el brazo izquierdo completamente.
- 1-4 Pts Disminuyó la fuerza de la extremidad anterior al tratar de tomar algo en que sujetarse, tomadas de la base de la cola.
- 1-8 Pts El circundar espontáneo o el caminar al lado contralateral.
- 1-4 Pts Insensibles al estímulo (estado de alerta).

4.2.4. Obtención de muestras para RPE y pruebas bioquímicas

Para cada animal transcurrido el tiempo (producida la IC), se efectuó la técnica de extracción de sangre. Para ello se aplicó el anestésico pentobarbital sódico vía intraperitoneal (45 mg/kg), posteriormente se colocó un tubo de polietileno PE50 en la arteria carótida izquierda y se extrajo 4-6 ml de sangre. Para evitar la coagulación de ésta se usó una pequeña porción de EDTA en tubos eppendorf de 2 ml. La sangre fue centrifugada a 1200 g durante 15 min a 4 ± 1 °C. Se obtuvo el plasma, éste fue colocado en tubos eppendorf y guardado a -79 ± 1 °C hasta la determinación de variables bioquímicas.

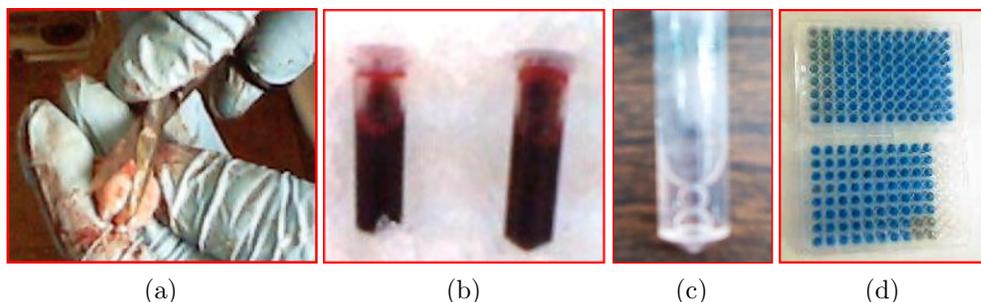


Figura 4.3: Obtención de muestras.

(a) Corteza cerebral , (b)sangre, (c) plasma y (d) determinación de proteínas.

Las pruebas bioquímicas consideradas para este estudio se enlistan a continuación:

- Determinación de proteínas
- Superóxido dismutasa
- Malondialdehído (modificación de los lípidos por RL)
- Carbonilo (modificación de las proteínas por RL)

Las cuales fueron efectuadas mediante los paquetes Cayman Chemical, cuyos números de catálogo son respectivamente: 704002, 706002, 10009055 y 10005020 [49]. Las muestras obtenidas para pruebas bioquímicas y RPE fueron corteza cerebral de ambos hemisferios y plasma colocados en tubos eppendorf guardados a -79 ± 1 °C hasta el momento de su uso.

4.3. RPE en sistemas biológicos

La RPE es una espectroscopia de absorción en la cual radiación de microondas produce transición entre niveles de energía magnética de electrones desapareados. El uso de la espectroscopia RPE ha ido creciendo como un complemento de otros métodos de análisis en problemas de bioquímica y biomedicina como una herramienta altamente sensible para la detección de especies de RL. Entre las aplicaciones bioquímicas de la detección de RL se encuentran: intermediarios metabólicos, radicales inducidos por la radiación externa, toxicidad, radicales derivados de la reducción parcial del oxígeno y radicales generados en tejidos [10, 50, 51].

En general el tipo de información disponible que puede obtenerse de experimentos RPE es la presencia, cantidad (cuantificación relativa), naturaleza (diferenciación entre RL y metales de transición paramagnéticos) y el entorno (como la presencia de núcleos magnéticos) de moléculas paramagnéticas [51]. La RPE puede ser observada en biomoléculas que incorporan átomos con capas electrónicas semillenas o átomos con un electrón externo desapareado (RL).

4.3.1. Espectrómetro de RPE

Los espectros obtenidos en este trabajo, fueron obtenidos en un espectrómetro JEOL JES-RE3X que está conectado a una estación de trabajo ES-PRIT, la cual consta principalmente de una computadora HP-9000 con una tarjeta de conversión analógica digital (A/D).

Software

El equipo de computo consta de una estación de trabajo HP-9000 Serie 400, con procesador de 32-bit, disco duro de 600MB, unidad de cinta DAT, monitor de 16 pulgadas de 1280 X 1024 puntos, con 256 colores, Plotter HP. El paquete de programación (software) JEOL ES-PRIT realiza las operaciones de adquisición y procesamiento de datos, simulación, impresión de gráficas en el plotter y utilería para archivos.

4.3.2. Detección experimental

Los espectros RPE fueron corridos a 77 K en banda X. Mediante el uso de un Dewar con nitrógeno líquido que es colocado en la cavidad resonante que se encuentra entre el electroimán, al cual se introduce un tubo capilar de cuarzo (de aproximadamente 0,5 mm de diámetro por 10 cm de longitud) donde en la parte inferior es colocado un tubo eppendorf en el que se encuentra la muestra de tejido y/o plasma. El tubo capilar, dentro de la cavidad resonante, se coloca a una distancia definida y preestablecida que garantice que la muestra esta exactamente en el centro de la cavidad para de este modo poder obtener el espectro. Las características generales de las mediciones a baja temperatura fueron: frecuencia de modulación 100 kHz, tiempo de barrido 2 minutos, amplitud de modulación: 1,6 G para tejido y plasma ventana cerrada ($335 \pm 4 \times 1$ mT) y 1,25 G para plasma ventana abierta ($250 \pm 2,5 \times 100$ mT), potencia de 1 mW.

4.4. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm la incertidumbre expandida ($\mu_z \pm U_{\mu_z}$). Para el análisis estadístico se aplicaron las pruebas de ANOVA de una vía, para evaluar el curso temporal, aplicando la prueba de Tukey para definir diferencias en cada punto temporal. Se tomó como nivel de significancia estadística $p < 0,05$.

Capítulo 5

Resultados y discusión

En este capítulo analizaremos los espectros RPE, obtenidos del modelo experimental de IC. Los espectros pertenecen a plasma y tejido (corteza cerebral); de éste último se obtuvo muestras de zona de infarto (ZI), hemisferios izquierdo (HL) y derecho (HR). En la fig. 5.1 se muestra un espectro RPE y el significado de sus respectivos ejes.

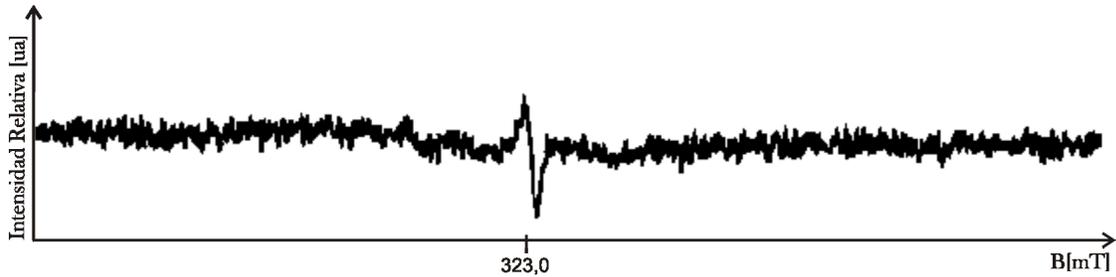


Figura 5.1: Espectro RPE mostrando un radical libre.

Por simplicidad los espectros mostrados sólo contendrán el eje horizontal (de campo magnético). Para su análisis, se han considerado dos secciones: la primera para plasmas **control** y tejidos **control**; es decir, provenientes de aquellos animales que estuvieron sujetos a las mismas condiciones de anestesia y en los cuales no se indujo IC. La segunda sección, para muestras obtenidas de los animales que fueron sometidos a IC. Las condiciones del equipo para la obtención de los espectros RPE están dadas en la sección 4.3.2. Las tablas que presentan las características de las señales contienen: la magnitud del campo magnético ($|\vec{B}|$ en mT), el valor espectroscópico calculado (g), ancho de línea (Γ en mT) e intensidad relativa (I en unidades arbitrarias).

5.1. Espectros RPE del grupo control

5.1.1. Tejido cerebral

El grupo **control** presentó un espectro RPE como el que se muestra a continuación:

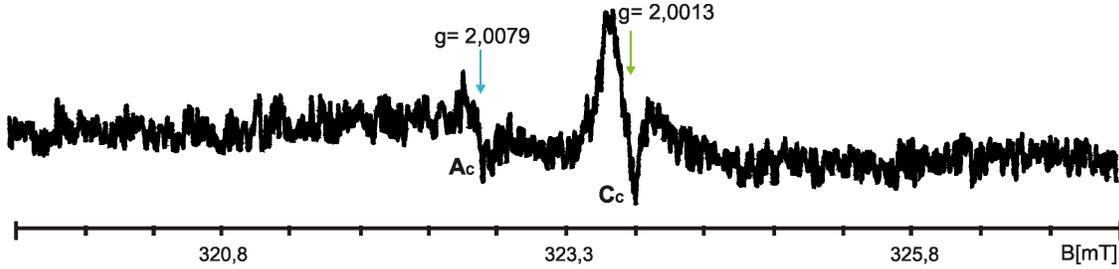


Figura 5.2: Espectro RPE del grupo control de tejido cerebral.

Este espectro presenta al menos dos señales a las cuales hemos llamado A_c y C_c . El subíndice c lo hemos asociado al grupo **control**. Las características de estas señales se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Características de las señales del grupo control correspondientes a tejido.

Señal	B [mT]	g	Γ [mT]	I [ua]
A_c	$322,7 \pm 0,3$	$2,0081 \pm 0,0019$	$0,13 \pm 0,03$	449 ± 177
C_c	$323,7 \pm 0,3$	$2,0017 \pm 0,0018$	$0,17 \pm 0,02$	1012 ± 99

El valor de ancho de línea para la señal A_c es pequeño como para tratarse de un metal y grande como para deberse a un RL aislado. La señal A_c , es el rasgo principal de una señal rómbica más compleja debida a la interacción dipolo-dipolo de un metal con un RL.

En sistemas biológicos la clase de compuestos más importantes que contienen metal, son aquellos formados por un ion metálico y ligantes porfirínicos. El anillo porfirínico con el ion metálico Fe^{2+} , forman una clase de compuestos llamados hemoproteínas (fig. 5.3)[52]. La corteza cerebral en su composición contiene este grupo. Producido localmente por algunos tipos celulares, el NO es un radical inestable con una vida media biológica de tan sólo unos pocos segundos ($< 5\text{s}$). El NO es paramagnético y con facilidad forma un complejo estable nitrosil con metales, compuestos o metaloproteínas [53, 54].

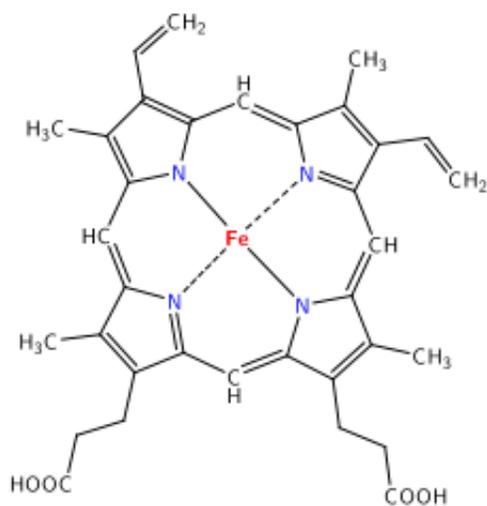


Figura 5.3: Estructura del grupo hemo

El hierro en el estado de oxidación 2+ es el metal que interactúa con el RL. El grupo hemo enlaza al NO antes de que éste y el superóxido produzcan peroxinitrito [4], actuando como un atrapador de espín natural; produciendo un aducto de NO: NO-Fe²⁺ hemo-nitrosil [50].

Es importante hacer incapié que las señales RPE atribuidas a NO-Fe²⁺ son diferentes dependiendo de si el NO se une a la hemo-subunidad α o β , así como en la conformación del estado de la hemoglobina (Hb). Siendo ésta última el transportador de oxígeno en el sistema sanguíneo.

De la señal A_c se infiere un triplete incipiente que proviene de la interacción del espín del electrón con el espín nuclear $I=1$ perteneciente al nitrógeno involucrado en el radical NO. El valor de I es obtenido de la regla mecánico cuántica # de líneas = $2I+1$ [55]. Como resultado de lo que previamente se ha mencionado, indudablemente es el espín nuclear del nitrógeno quien interactúa con el espín del electrón.

Por otra parte, en otros estudios se ha detectado una señal semejante a la señal A_c con una intensidad mucho mayor (en los cuales las muestras de tejido fueron corazón e hígado). Simulaciones han demostrado que dicha señal está compuesta por tres especies paramagnéticas con acoplamiento hiperfino [50, 57]. La figura 5.4 muestra la simulación mencionada anteriormente.

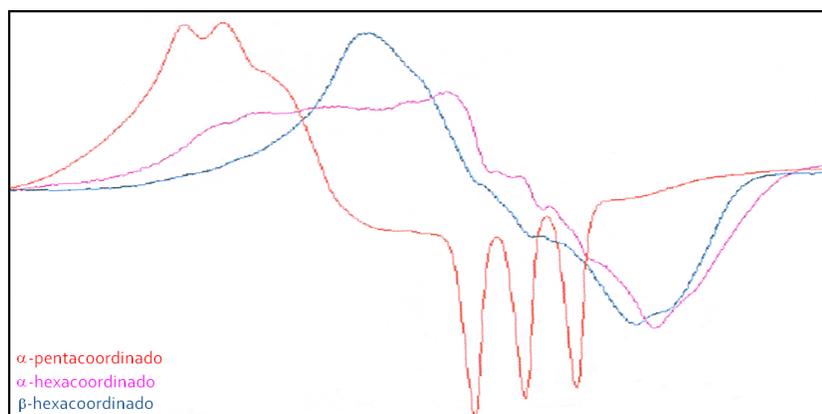


Figura 5.4: Simulación del NO-Fe²⁺.

En el presente trabajo la intensidad de esta señal que es semejante a la señal A_c es muy pequeña, debido a que la muestra considerada es tejido cerebral. Los rasgos incipientes de la interacción hiperfina se pueden apreciar en los espectros obtenidos aunque no una señal como la mostrada en la fig. 5.4 (véase apéndice C).¹

Debido a su ancho de línea y valor espectroscópico $g \approx 2$, la señal C es asignada a la presencia no específica de RL. Estos se encuentran presentes en cantidades diversas en las muestras obtenidas *in vivo* debido a las reacciones bioquímicas presentes en las células [58]. Superpuesta en la señal A_c se encuentra la señal C_c , en donde existe superposición de la tercera línea del triplete y la cola izquierda de la señal C_c .

Cabe por último mencionar que en las reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células seguida de la IC, las especies reactivas de oxígeno y **nitrógeno** están presentes [53, 54, 56]. Estudios han mostrado que el NO puede tener ambos papeles como agente protector y/o dañino, dependiendo del tipo de célula que lo produjo y la fase de la isquemia. El NO es producido por tres diferentes isoformas de la sintasa de NO (NOS).

¹Para hacer una simulación en la computadora del equipo RPE, los valores espectroscópicos paralelo y perpendicular (g_{\parallel} y g_{\perp}), su isotropía o anisotropía (de g), valor de espín electrónico y nuclear (en el caso de considerarse), anchos de línea (Γ_{\parallel} y Γ_{\perp}) son los primeros parámetros considerados para efectuar la simulación. La forma de la distribución (lorentziana o gaussiana) e intensidades relativas son parámetros que pueden ser elegidos y variados hasta que se observe la mejor aproximación de la señal simulada con la señal obtenida experimentalmente, ésta última está presente en la pantalla en donde se efectúa la simulación.

5.1.2. Plasma

Para la obtención de los espectros RPE para plasma se consideraron dos ventanas: la primera de $335 \pm 4 \times 1$ mT la cual llamamos ventana cerrada y la segunda de $250 \pm 2,5 \times 100$ mT nombrada como ventana abierta. El grupo plasma **control** presentó un espectro RPE como el mostrado en la fig. 5.5, el cual fue obtenido a ventana cerrada.

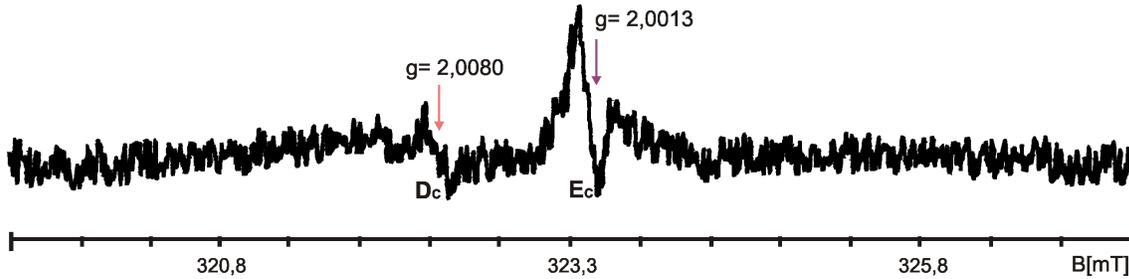


Figura 5.5: Espectro RPE de plasma del grupo control a ventana cerrada.

Este espectro presenta al menos dos señales principales denotadas por las letras D_c y E_c . Dichas señales tienen el mismo significado que las señales A_c y C_c respectivamente, sus características pueden verse en la tabla 5.2.

Tabla 5.2: Características de las señales del grupo control correspondientes a plasma.

Señal	B [mT]	g	Γ [mT]	I [ua]
D_c	$322,3 \pm 0,2$	$2,0081 \pm 0,0003$	$0,15 \pm 0,05$	496 ± 45
E_c	$323,4 \pm 0,2$	$2,0013 \pm 0,0002$	$0,15 \pm 0,05$	1039 ± 79
F_c	$148,3 \pm 2,9$	$4,3664 \pm 0,0840$	$10,25 \pm 1,17$	684 ± 72
J_c	$305,5 \pm 1,8$	$2,1189 \pm 0,0110$	$6,13 \pm 1,00$	538 ± 221

Los espectros RPE de plasma **control** obtenidos a ventana abierta presentan dos señales denotadas como F_c y J_c (fig. 5.6). La señal F_c es una señal ancha proveniente de un centro paramagnético (véase tabla 5.2), ésta señal se asigna a iones de Fe^{3+} de alto espín $S=5/2$ (campo magnético bajo). La señal J_c es parte de los rasgos espectrales asociados NO-Fe^{2+} y RL , esto se debe a que las muestras (plasma) contienen al grupo hemo. En otras palabras, las señales D_c y E_c componen a la señal J_c la cual fue detectada a ventana abierta [52].

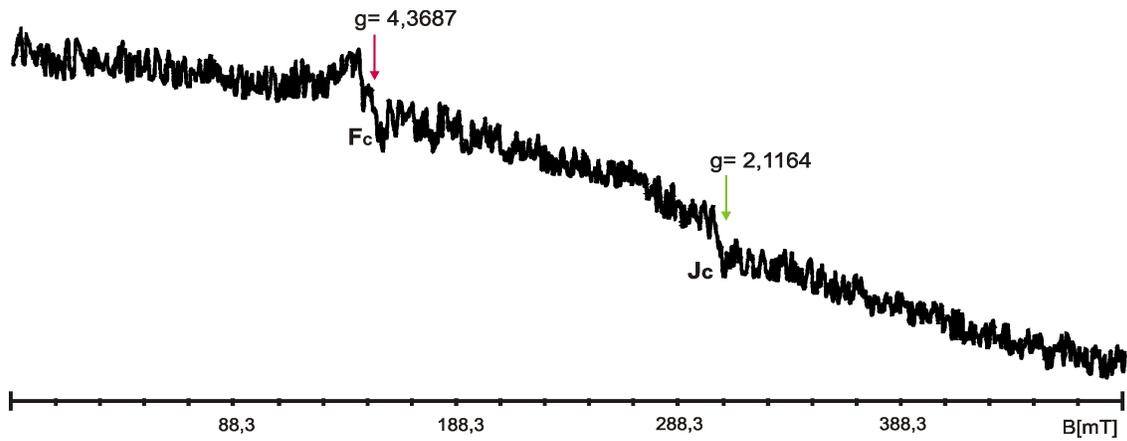


Figura 5.6: Espectro RPE de plasma del grupo control a ventana abierta.

La finalización de esta sección puede resumirse en lo siguiente: las especies paramagnéticas y los RL presentes en las muestras pertenecientes al grupo **control** detectadas mediante RPE han sido identificadas.

5.2. Espectros RPE de los grupos sometidos a IC

5.2.1. Tejido cerebral

Los espectros RPE obtenidos de las muestras de tejido pertenecientes a los grupos sometidos a IC son semejantes a los espectros obtenidos del grupo **control**, por esta razón no son mostrados en esta subsección². La interpretación y etiquetas asignadas a dichas señales es exactamente la misma que se dió en la subsección 5.1.1, aunque veremos que hay un cambio significativo en dos parámetros: en su intensidad y concentración relativa con respecto al grupo **control**.

Como ejemplo, a continuación se muestra el espectro que presentó la ZI:

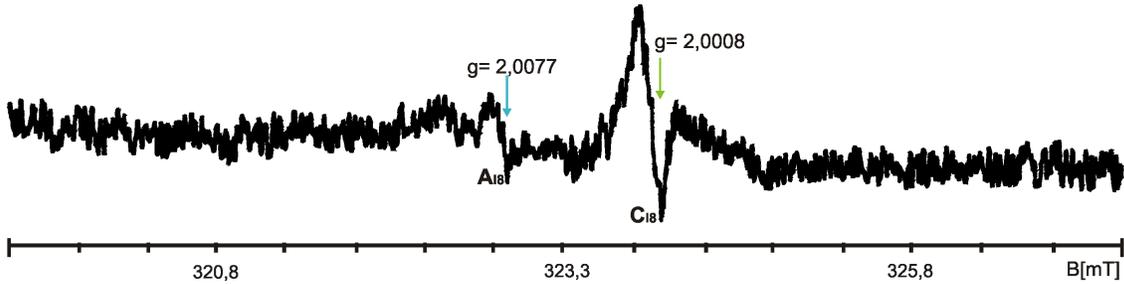


Figura 5.7: Espectro RPE de la ZI a las 8 hrs. después de la IC

En las tablas 5.3 y 5.4 se muestran las características de las señales. Cada renglón fué asociado a los diferentes tiempos considerados en este estudio, es decir; 1, 4, 8 y 16 horas después de la IC. En particular, la tabla 5.3 muestra las características de las señales A y C de muestras pertenecientes a la ZI.

Tabla 5.3: Características de las señales A y C para la ZI.

g	Γ [mT]	I [ua]	g	Γ [mT]	I [ua]
$2,0096 \pm 0,0052$	$0,14 \pm 0,01$	493 ± 155	$2,0011 \pm 0,0001$	$0,17 \pm 0,03$	1101 ± 128
$2,0077 \pm 0,0001$	$0,16 \pm 0,05$	432 ± 141	$2,0011 \pm 0,0002$	$0,18 \pm 0,02$	1100 ± 319
$2,0077 \pm 0,0001$	$0,14 \pm 0,03$	542 ± 209	$2,0009 \pm 0,0002$	$0,17 \pm 0,03$	1215 ± 301
$2,0076 \pm 0,0001$	$0,16 \pm 0,03$	522 ± 186	$2,0015 \pm 0,0018$	$0,16 \pm 0,03$	1178 ± 297

(a) Señal A

(b) Señal C

²Para más detalles véase apéndice C.

Las características de las señales correspondientes de los hemisferios se muestran en la tabla 5.4.

Tabla 5.4: Características de las señales A y C después de la IC.

HL			HL		
g	Γ [mT]	I [ua]	g	Γ [mT]	I [ua]
2,0078±0,0003	0,14±0,05	417±44	2,0012±0,0002	0,18±0,02	1045±149
2,0077±0,0003	0,16±0,05	544±128	2,0011±0,0004	0,16±0,05	1136±130
2,0078±0,0002	0,15±0,04	457±114	2,0011±0,0002	0,15±0,04	1126±182
2,0077±0,0003	0,16±0,02	478±91	2,0008±0,0001	0,14±0,04	1105±181
HR			HR		
g	Γ [mT]	I [ua]	g	Γ [mT]	I [ua]
2,0086±0,0021	0,14±0,03	444±72	2,0011±0,0001	0,16±0,02	1032±152
2,0077±0,0003	0,12±0,03	453±132	2,0012±0,0001	0,16±0,04	983±217
2,0078±0,0003	0,15±0,02	414±116	2,0010±0,0001	0,16±0,02	1111±156
2,0076±0,0002	0,16±0,03	507±148	2,0010±0,0001	0,15±0,02	1102±182

(a) Señal A

(b) Señal C

5.2.2. Plasma

Los espectros RPE obtenidos de las muestras de plasma de los animales sometidos a IC para ambas ventanas son semejantes a los ya presentados para plasma **control**. Por este motivo son omitidos en esta subsección. Su evolución temporal se muestra en el apéndice C y su interpretación es la misma que dió en la subsección 5.1.2.

Las especies paramagnéticas y RL en los grupos **control** y los sometidos a **IC** han sido identificadas. En las dos secciones siguientes, se estudian las características I (intensidad relativa) e A (cantidad relativa) de las señales detectadas, considerando sus magnitudes como parámetros. Seguir el curso temporal de éstos fué de gran interés, obteniendo de ello el monitoreo de los cambios en la producción de RL.

5.3. Análisis Cuantitativo

Se determinó la magnitud de las intensidades relativas para todas las señales de los espectros estudiados, con el fin de comparar si existen diferencias entre los grupos. Primeramente, para las señales A y C, la fig. 5.8 nos muestra el comportamiento general de sus intensidades relativas con base en los resultados de las tablas 5.1, 5.3 y 5.4.

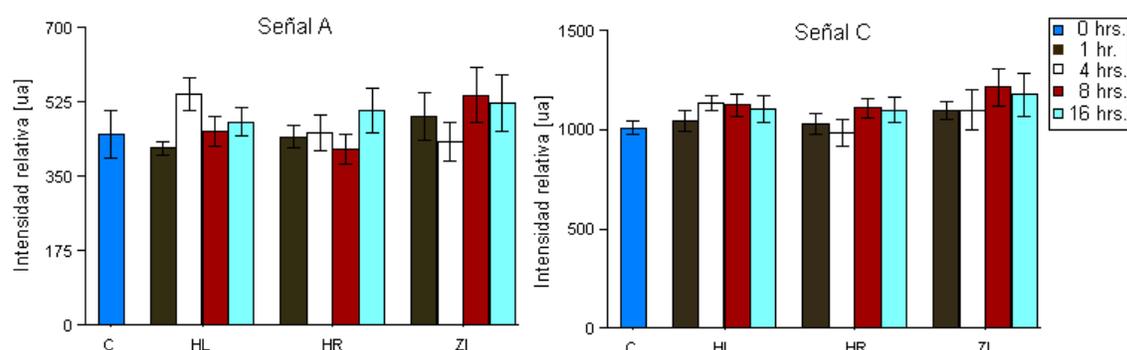


Figura 5.8: Gráfico comparativo de intensidades para las señales A y C.

Los cambios en las intensidades relativas de las señales A y C seguida de la IC respecto del grupo control son poco notables como se puede observar en la gráfica de barras (fig. 5.8).

Para el estudio de la producción de RL y especies paramagnéticas en el transcurso temporal de la IC, se analizará cuantitativamente los cambios en las intensidades relativas. Para ello, el valor de la intensidad relativa de cada señal es normalizada, esto se hace para observar si existen cambios en las intensidades de los grupos sometidos a IC respecto del grupo control. Además, debido a “pequeñas” diferencias observadas en la gráfica de barras, se consideró también el cociente del valor de la intensidad relativa del HR entre el HL, es decir, debido a que el hemisferio dañado es el derecho observaremos si hubieron cambios de éste con respecto al hemisferio no afectado. - Obsérvese que el valor $I_{HR} / I_{HL} = [I_{HR}/I_c] / [I_{HL}/I_c]$, donde I_c es el valor de la intensidad relativa control. Los valores calculados se muestran en la tabla 5.5-.

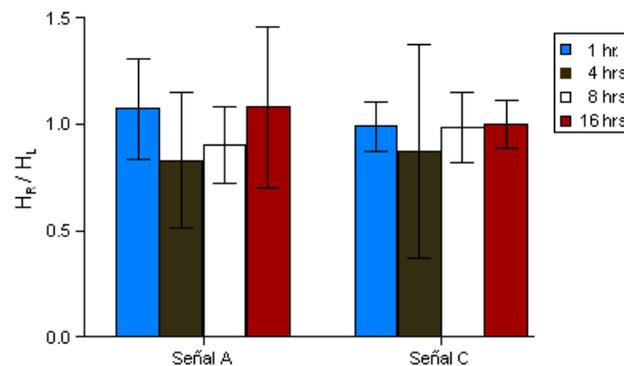
Los resultados de los cocientes mencionados se muestran en la tabla 5.5. Examinando la segunda y tercer columna de la tabla 5.5 correspondientes a las señales A y C se distinguió un valor mínimo y uno máximo a las 4 y 16 horas respectivamente.

Tabla 5.5: Valores de H_R/H_L e infarto.

Grupo [hrs]	A	C	Z.I (A)	Z.I (C)
1	1,074±0,236	0,992±0,117	1,098±0,344	1,088±0,127
4	0,832±0,319	0,872±0,503	0,962±0,315	1,087±0,315
8	0,905±0,178	0,988±0,166	1,207±0,467	1,201±0,297
16	1,080±0,378	1,001±0,116	1,162±0,927	1,164±0,293

Para la señal A: en 1 y 16 horas la intensidad relativa de NO-Fe²⁺ fue mayor en el HR que en el HL, ocurriendo lo contrario a las 4 y 8 horas (fig.5.9). Esto implica que si el aumento relativo de NO-Fe²⁺ a la primera hora contrarrestó el daño al tejido, a las 4 y 8 horas se presentó daño debido a la disminución de NO-Fe²⁺ en el hemisferio isquémico.

En la señal C la tercera columna muestra que $I_{HL} > I_{HR}$ de 1- 8 horas hasta que en las 16 horas $I_{HL} < I_{HR}$ (véase tabla 5.5). -Es decir, que la intensidad relativa de RL deslocalizados fue mayor en el hemisferio contralateral que en el isquémico-. Esto significa que en el transcurso temporal de la IC la intensidad relativa de RL en el HR aumentó.

Figura 5.9: Gráfico comparativo del cociente H_R/H_L .

Por otra parte, para observar los comportamientos de las intensidades de las señales A y C en la zona isquémica con respecto de los valores basales, se consideró el cociente de la intensidad relativa a un tiempo t entre el valor de la intensidad relativa del grupo control. Para ambas señales el valor mínimo y máximo fueron a las 4 y 8 horas respectivamente.

La intensidad relativa en la ZI de la señal C aumentó en el transcurso temporal de la IC. Por otro lado, la intensidad relativa de NO-Fe^{2+} en la ZI incrementó en la primera hora y después de las 4 horas. Una discusión más detallada acerca de NO-Fe^{2+} se tratará más adelante.

Para plasma se hizo también la gráfica de barras (señales D, E, F y J) las cuales son mostradas en la fig. 5.10. Como se puede apreciar en esta figura las intensidades relativas para las señales D,E y F decrecen. Para la señal J no se aborda este análisis debido a su interpretación. La disminución de las intensidades relativas fue debido a la estimulación de la defensa AO. Aunque después de las 16 horas el proceso que hizo disminuir las intensidades decae y por tanto las intensidades aumentaron para los casos de las señales D y E pero aún siendo esta última menor al valor basal, para la señal F la intensidad si sobrepasó el valor basal.

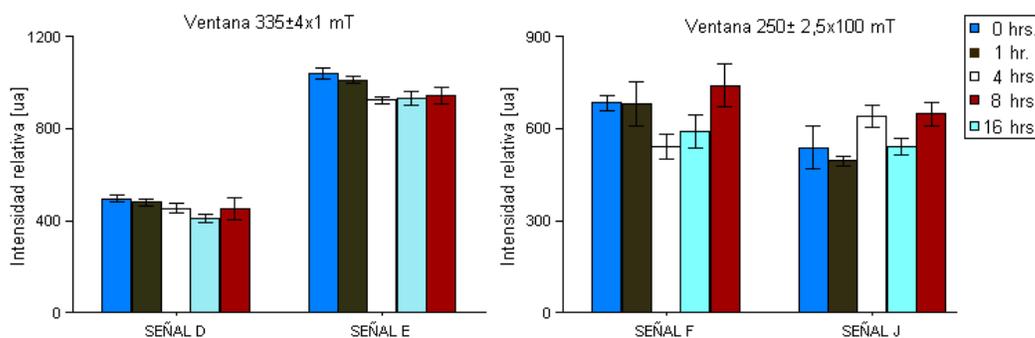


Figura 5.10: Gráfico de intensidades relativas para las señales D,E,F y J.

Los resultados anteriormente expuestos, muestran que existe una dependencia temporal de la IC con la producción de RL y especies paramagnéticas. Esta dependencia puede ser observada en las diferencias de las intensidades relativas de las señales detectadas de las muestras de tejido cerebral y plasma bajo estudio mediante la técnica RPE.

Los resultados obtenidos de plasma fueron considerados para conocer el comportamiento de los parámetros de las señales detectadas, de éstos y los obtenidos de corteza cerebral ahora se conoce que difieren. Este estudio es muy relevante, ya que en un futuro se puede proponer el uso de la técnica RPE en el estudio de entidades patológicas en la especie humana, tomando el plasma como la muestra bajo estudio.

5.4. Evaluación neurofisiológica

De acuerdo a los puntos que se mencionaron en la subsección 4.2.3 la evaluación neurofisiológica (EN) para cada cada animal es considerada como la suma de los puntos sobre cada valoración.³ Para estudiar el daño neurológico por grupo se calculó su promedio, considerando la valoración neurofisiológica total de cada animal. En la fig. 5.11 se muestra la gráfica de barras del comportamiento general de los valores obtenidos en la evaluación neurofisiológica.

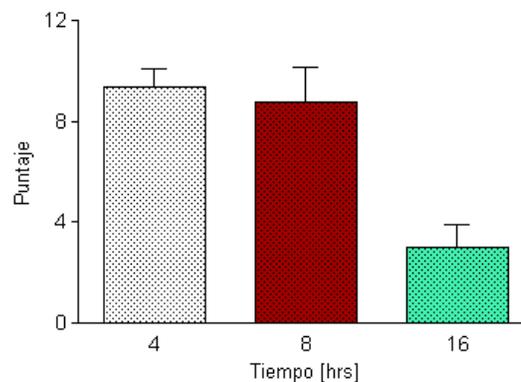


Figura 5.11: Gráfico de la evaluación neurofisiológica.

Se determinó mediante análisis estadístico que hay diferencia significativa $p=0,0008$ (ANOVA una vía) para los grupos de 4, 8 y 16 horas. Además $p<0,05$ (Tukey) comparando 16 con 4 y 8 horas. La máxima puntuación que evalúa el daño neurológico fue a las 4 horas. Después de este tiempo hay un “cambio” sutil a las 8 horas mientras que a las 16 horas es notable. Es decir, el daño neurológico decreció en el transcurso temporal de la IC.

Por otra parte, se sabe que debido a la oclusión completa de la arteria cerebral media resulta la pérdida de movimiento y sensación sobre el contralateral o el lado opuesto al del infarto [14]. Esto último es lo que se evaluó y se presentó previamente (fig.5.11). A su vez esto implica que para que exista un mayor daño neurológico tuvo que haberse causado daño en el hemisferio isquémico, lo que a su vez implica la presencia de RL.

³A una hora seguida de la IC, la evaluación neurofisiológica no se efectuó por las condiciones de anestesia sobre el animal.

Si comparamos este razonamiento con los resultados obtenidos de las intensidades relativas por el estudio RPE, en donde se vió que a las 4 horas los valores mostrados en la tabla 5.5 son mínimos, podría decirse que no necesariamente la intensidad relativa de RL es mayor si el daño neurológico lo fué.

Además, de los valores mostrados en la tabla 5.5 para las señales A y C (sólo para ambos hemisferios) siguiendo su curso temporal pudo afirmarse que las cantidades de entes paramagnéticos y RL incrementaron en el HR. De esto y del párrafo anterior, se observó que la relación entre las intensidades relativas de las señales y el daño neurológico son inversos.

Curiosamente, para el RL proveniente de electrones, a las 4 horas su intensidad relativa toma el valor más pequeño en el HR ($0,971 \pm 0,129$) y un valor máximo ($1,122 \pm 0,129$) en el HL.

En la fig. 5.12 se puede observar el comportamiento a partir de las 4 horas de los cocientes considerados para las señales A y C seguida de la IC y la puntuación en el daño neurológico.

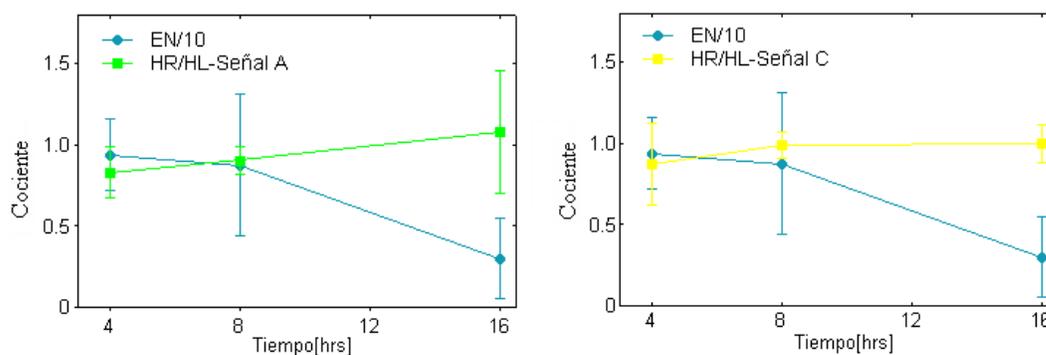


Figura 5.12: Gráfico que muestra la correlación de la EN y H_R/H_L .

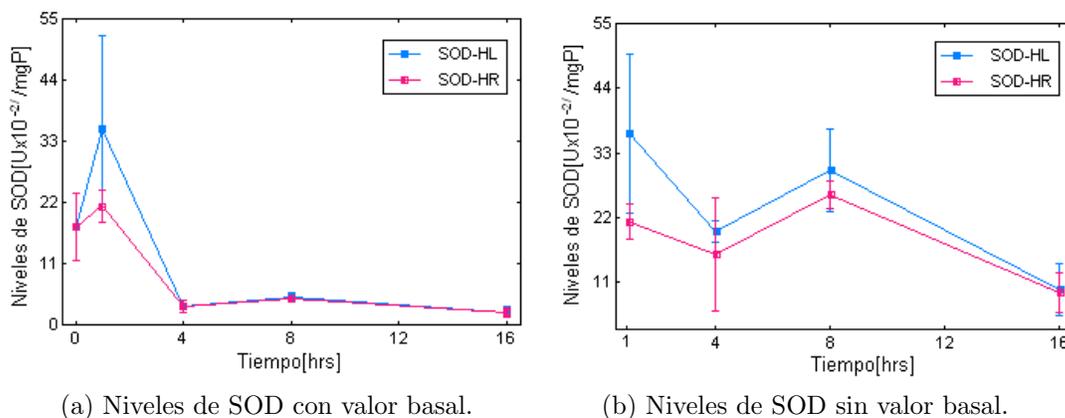
De la técnica RPE utilizada para este estudio y la EN efectuada se ha visto que éstos tienen una correlación. Esto es, se encontró que los daños neurológicos seguida de la IC están relacionados con lo cambios en la evolución temporal de especies paramagnéticas y RL, es decir, con la producción de RL una vez inducida dicha patología.

5.5. Análisis de pruebas bioquímicas

Expresamos los resultados obtenidos de SOD, MDA y carbonilo por mg de proteína (mgP) obtenido de la determinación de la misma.

5.5.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

EL SOD representa la primera línea de defensa de estrés oxidativo [43]. En la fig. 5.13 se muestran gráficas de los niveles de SOD para ambos hemisferios. En el lado derecho no se consideraron los valores basales (fig.5.13b). Esto se hizo para observar más a detalle los comportamientos del curso temporal de los niveles de SOD.



(a) Niveles de SOD con valor basal.

(b) Niveles de SOD sin valor basal.

Figura 5.13: Las correspondientes gráficas presentan los niveles de SOD en ambos hemisferios (HL y HR) en el transcurso temporal de la IC.

En la primera hora los niveles de SOD respecto de los valores basales aumentan. Fisiológicamente quiere decir que posterior a la IC, el sistema AO responde ante el aumento de una producción de RL (como se vió en la sección 5.3). Posterior a las 4 hrs. de la IC se aprecia que los niveles de SOD disminuyeron respecto de los valores basales. Esto sucede para ambos hemisferios. En el hemisferio contralateral los niveles fueron mayores $1,3 \pm 0,1$ veces los niveles de SOD_R (que en el hemisferio isquémico). Probablemente esto tenga una correlación con el resultado de la sección 5.3 donde las intensidades relativas de la señal C fueron mayores en el HL y entonces los niveles de SOD deberían de ser mayores en éste que en el HR.

Se graficó la suma de las cantidades relativas de RL detectadas en el tejido cerebral y los niveles de SOD seguida de la IC.

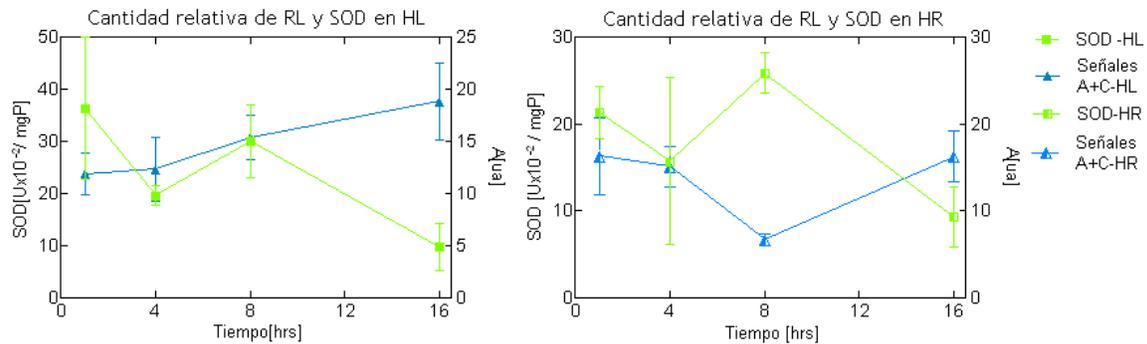


Figura 5.14: Cantidad relativa de RL y niveles de SOD graficados con el objetivo de observar ambos comportamientos de uno respecto del otro en el transcurso temporal de la IC.

En la fig. 5.14 del lado derecho correspondiente al hemisferio isquémico se puede apreciar el comportamiento del sistema AO debido a la producción excesiva de RL. Es decir, a partir de las 4 hrs. posterior a la IC mientras los niveles de SOD aumentan la cantidad relativa de RL decrece. Mientras que en el HL, la cantidad relativa de RL aumenta durante todo el transcurso temporal como si los niveles de SOD no estuvieran actuando sobre el.

Por otra parte, al extraer el cerebro en un tiempo igual a 8 horas seguida la IC se observó de manera directa la zona de penumbra (véase fig.5.15).

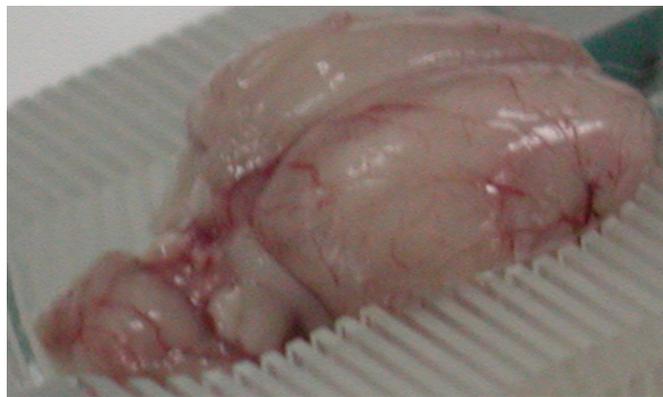


Figura 5.15: Penumbra isquémica a las 8 hrs.

En el hemisferio isquémico los niveles de SOD aumentan notablemente a las 8 horas y la cantidad relativa de RL disminuye (fig.5.14). Además a este tiempo el porcentaje de la zona isquémica es máximo (como se verá en la sección 5.6).

Es decir que a este tiempo la actividad del SOD aumentó considerablemente lo que se refleja en la disminución de la cantidad relativa de RL. En la literatura se ha reportado que la actividad de SOD aumenta en la zona de penumbra [43]. La evidencia de lo anteriormente dicho, de los resultados de RPE (cantidad relativa de RL) y de los niveles de SOD la existencia de la zona de penumbra observada es consistente. Esto es de gran importancia ya que el periodo de tiempo durante el cual la penumbra persiste, representa una oportunidad potencial terapéutica.

5.5.2. Malondialdehido (MDA)

El MDA es un producto natural de la peroxidación del lípido [56]. Se encontró que los niveles de MDA disminuyen con respecto a los niveles del grupo control. Esto sucede para ambos hemisferios, los puntos mostrados en la fig. 5.16 están por debajo del valor obtenido del nivel de MDA control (no mostrado aquí).

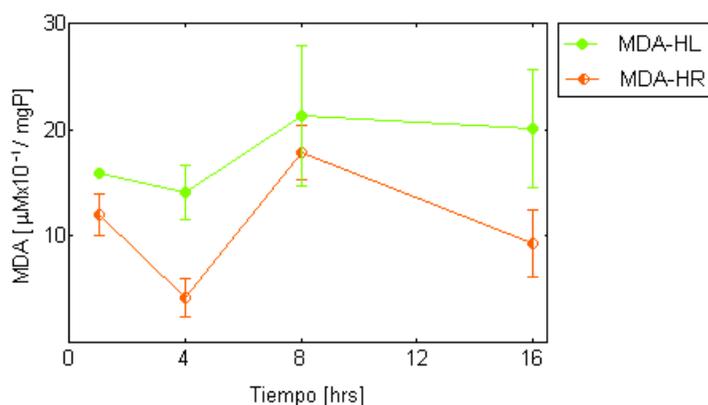


Figura 5.16: Niveles de MDA para las muestras correspondientes a HL y HR con $p < 0,05$ (ANOVA dos vías). Esto quiere decir que hay diferencia significativa de los niveles de MDA entre ambos hemisferios.

Los niveles de MDA son mayores en el (HL) por factor de $1,7 \pm 0,5$ (fig.5.16). En ambos hemisferios su mínimo valor es a las 4 horas y el máximo a las 8 horas. El valor hallado por ANOVA (una vía) indica que no hay diferencia de los niveles de MDA durante el curso temporal pos-ictal (período durante un ataque repentino) para el HL ($p > 0,05$), mientras que en el HR ($p = 0,003$) sí hay. El MDA se redujo significativamente en el HR, 4 y 16 horas después de la OACM. Esto resulta interesante ya que se esperaba lo contrario. En la siguiente página se explican estos resultados.

El HR es el isquémico, en el se suponía que el MDA no disminuyera sino que aumentara ya que éste es la certidumbre de lipoperoxidación. Esto es una consecuencia de la respuesta del tejido cerebral a la IC.

El MDA fué mayor en el HL que no es el isquémico, esto significa que en el HR hubo una “ adaptación ” al estrés oxidativo, es decir que se produjo más defensa AO endógena que abatió la lipoperoxidación. Por lo tanto si en este caso se da un AO exógeno (una droga antioxidante) podría ser contraproducente administrarlo porque se quitaría , al menos parcialmente, el estrés oxidativo que produce aumento de la defensa AO endógena que es la forma que tendría el cerebro para protegerse.

En la clínica (humanos) la IC en un sujeto normal no se da frecuentemente. Sólo se produce cuando hay un accidente que rompa un vaso o si se rompe un aneurisma (ambos, serían isquemia por hemorragia). En estos casos no sería conveniente administrar AO.

5.5.3. Correlación de SOD y MAD con RL.

En las dos subsecciones anteriores vimos que los niveles de SOD y MAD disminuyen con respecto de los valores basales después de haberse inducido la IC.

En la fig. 5.17 puede observarse el transcurso temporal de las concentraciones relativas de la señal A para HL, HR y ZI.

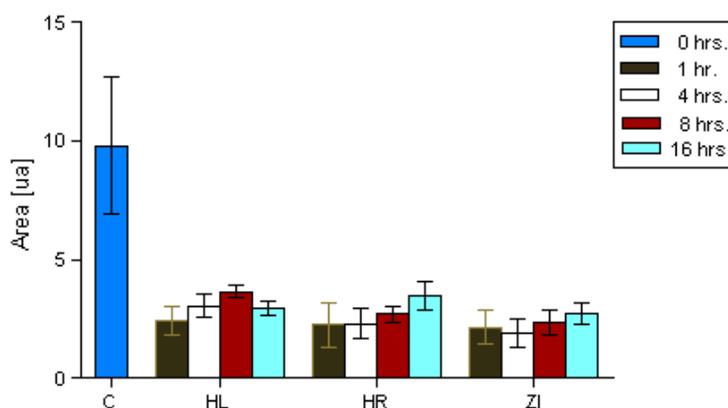


Figura 5.17: Valores del área bajo la curva de la señal A (Fe^{2+} -NO) para HL, HR y ZI. Los valores obtenidos posteriores a la IC son menores al valor basal. Hay diferencia significativa : $p < 0,001$ (ANOVA una vía) y $p < 0,01$ comparando los grupos (Tukey).

Por otra parte, el área bajo la curva de las señales disminuyó con respecto al valor basal y no se recuperó después de la OACM. Se puede apreciar en la fig. 5.17 que hubo disminución en la cantidad relativa de Fe^{2+} -NO (de acuerdo a la interpretación de la señal A). Es interesante que los comportamientos de lo descrito anteriormente se produjeron en ambos hemisferios (fig. 5.17).

La explicación de los párrafos anteriores es la siguiente: al inducirse la IC algún otro mecanismo AO disminuyó la lipoperoxidación y la concentración relativa de Fe^{2+} -NO. La reducción de la cantidad relativa de la señal A en la corteza cerebral después de la OACM fue debida a la estimulación de la defensa antioxidante endógeno.

Las cantidades relativas de la señal C aumentaron (fig. 5.18). Al haberse inducido la IC, en el HR existe una severa disminución de O_2 , lo que puede conducir a la muerte celular. Como respuesta a la hipoxia, hay una sobre activación de receptores de glutamato, aumento de células inflamadas y procesos patológicos que conllevan a la apoptosis.

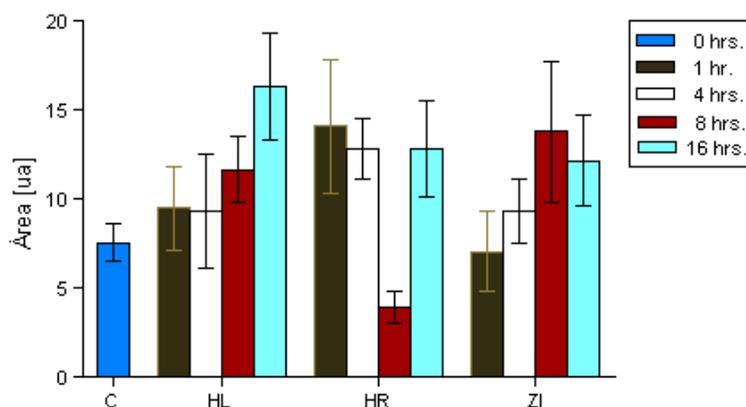


Figura 5.18: Valores del área bajo la curva de la señal C (RL proveniente de electrones) para HL, HR y ZI. Los valores obtenidos posteriores a la IC son mayores al valor basal.

Tras la isquemia, el endotelio vascular promueve inflamación a través de la liberación de citoquinas y la aparición de moléculas que permiten la adhesión y migración de los leucocitos circulantes dentro del sistema nervioso central (SNC). El problema que surge de la inflamación, es que la defensa se dirija hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos sanos. Esto es lo que sucedió en el HL, al haber hallado que la concentración relativa de la señal C aumentó de los valores basales.

5.5.4. Carbonilo

El indicador más comúnmente usado en la oxidación de proteínas es el contenido de carbonilo de la proteína.

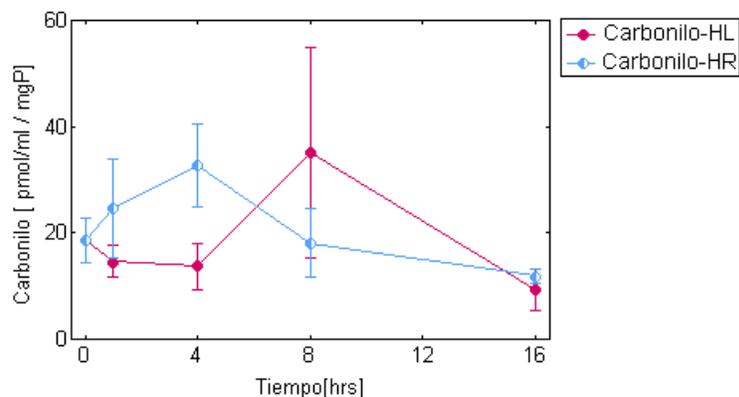


Figura 5.19: Contenido de carbonilo para los hemisferios HL y HR, $p > 0,05$ (dos vías ANOVA) lo que indica que no hubo cambios en el curso temporal y que no existe diferencia del contenido de carbonilo entre ambos hemisferios.

En la fig. 5.19 puede verse que en el intervalo de tiempo de 4-8 horas los niveles de carbonilo decrecen respecto de los valores control en el HL y posteriormente incrementan, el comportamiento es inverso para el HR. El valor alto de una incertidumbre es debida a los diferentes valores obtenidos de una variable medida. Por ejemplo, como la mostrada en la fig.5.19 a las 8 horas (HL), a pesar de que los animales estuvieron sujetos a las mismas condiciones experimentales la naturaleza del mismo tiene implicaciones en los resultados.

Por otra parte, haciendo un análisis estadístico en este estudio, indica que no hay diferencia significativa entre las medias de los niveles de carbonilo para ambos hemisferios en el transcurso temporal de la IC respecto de los valores basales.

-En la literatura se ha reportado que no existe diferencia de los niveles de carbonilo en pacientes con IC comparados con los control [56]-. Por otro lado, en los niveles de MAD en el HR se observaron cambios significativos una vez producida la IC ($p=0,003$) mientras que en el HL ($p > 0,05$) no, ¿estas diferencias significativas estarán correlacionadas con la cantidad alta de lípidos en el tejido cerebral?. Esta pregunta surgió a partir de haber hallado que en la oxidación de las proteínas no hay una diferencia significativa durante el curso temporal de la IC en ambos hemisferios.

Por lo tanto, podríamos especular que el factor o los factores que inducen un incremento en la oxidación de las proteínas no intervienen durante el transcurso temporal de la IC.

Para concluir esta sección, puede afirmarse que el estrés oxidativo juega un papel importante en la IC debido a los mecanismos que se activan durante y post-ictal. El estudio de pruebas bioquímicas en este trabajo reforzó y complementó al estudio RPE.

5.6. Discusión de volúmenes

Se calculó el volumen del hemisferio contralateral, isquémico y zona de infarto de cada animal.⁴ La siguiente gráfica de barras (fig. 5.20) muestra el transcurso temporal de dichos volúmenes seguida la IC.

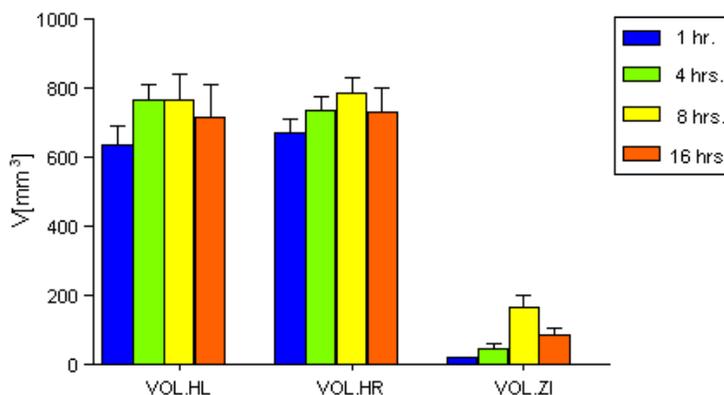


Figura 5.20: Transcurso temporal del volumen de hemisferio contralateral, isquémico y de la zona isquémica subsiguiente a la IC.

Como se observa el comportamiento general del volumen para HL, HR y ZI aumenta significativamente a las 4 horas, es máximo a las 8 horas y mínimo a la primera hora. El **volumen del HR** es igual a: $1,06 \pm 0,48$; $0,96 \pm 0,48$, $1,03 \pm 0,52$; $1,04 \pm 0,46$ veces el **volumen del HL** para 1, 4, 8 y 16 horas respectivamente, - para la observación de sus diferencias se consideró dos cifras significativas después del punto decimal-. El caso en el que la fracción $VOL.HR/VOL.HL < 1$ es evidente que el volumen en el hemisferio contralateral es mayor que el isquémico, tal caso se presenta a las 4 horas. El caso contrario ocurre debido a la oclusión de las arterias lo que conlleva a la inflamación en el hemisferio isquémico.

El porcentaje de infarto fue calculado mediante la ecuación:

$$\% \text{ ZI} = \frac{VOL. \text{ ZI}}{VOL. \text{ HR}} \times 100 \% \quad (5.1)$$

y el porcentaje de edema como:

$$\% \text{ Edema} = \left(\frac{VOL. \text{ HR}}{VOL. \text{ HL}} - 1 \right) \times 100 \% \quad (5.2)$$

⁴Los valores de éstos volúmenes se calcularon mediante la utilización de un modelo matemático propuesto (veáse los detalles en el apéndice C).

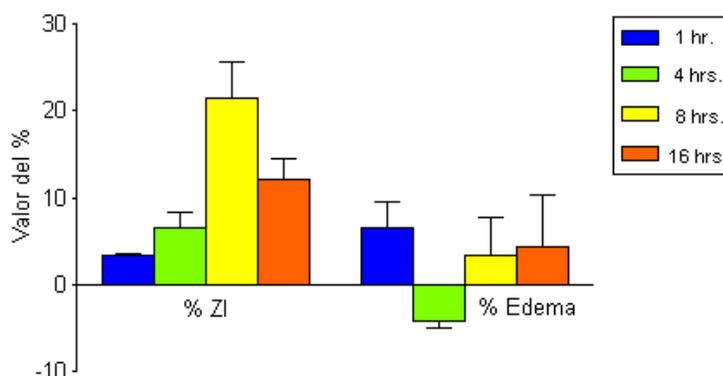


Figura 5.21: Transcurso temporal de los valores de porcentaje de infarto y edema. El valor negativo del porcentaje de edema es consecuencia de que $VOL.HR < VOL.HL$.

La fig. 5.21 presenta los resultados obtenidos de los cálculos utilizando las ecuaciones 5.1 y 5.2. De la fig. 5.20 se consideró que el comportamiento de los volúmenes es semejante en los tres casos, de lo dicho anteriormente y de la fig. 5.21 se concluyó que el volumen del tejido cerebral aumenta si el porcentaje de infarto es grande.

El porcentaje de infarto es máximo a las 8 horas mientras que el porcentaje de edema es mínimo. El porcentaje de edema toma un valor negativo a las 4 horas como consecuencia de que $VOL.HR < VOL.HL$. Si se considerara que este valor negativo equivale a un porcentaje de edema igual a cero la tendencia numérica muestra un comportamiento ascendente (la primera hora no es considerada ya que vimos no se hizo una EN en los animales). Además, revisando la tendencia numérica del daño neurológico su comportamiento es decreciente. Es decir que, existe una correlación inversa entre el porcentaje de edema y el daño neurológico.

Por otra parte, en la fig. 5.22 se observa que al haber un aumento en la cantidad relativa de RL hay una disminución en el volumen del HR y viceversa. Esto puede ser explicado por lo siguiente: la presencia de un infarto de mayor volumen, -lo que a su vez implica un aumento en el tejido cerebral-, es producto de que hubo una severa disminución de FSC, -falta de oxígeno y nutrientes-, lo que conlleva a su vez el aumento de células inflamadas que surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino.

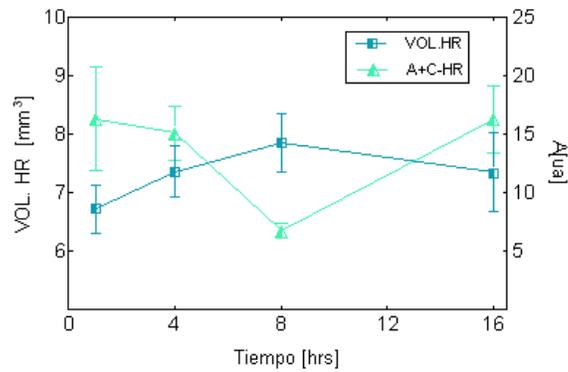


Figura 5.22: Gráfica que muestra el transcurso temporal tanto de la cantidad relativa de RL y centros paramagnéticos con el volumen del hemisferio isquémico.

Interesados en conocer si existe una correlación del porcentaje de infarto con la producción de RL se graficó lo siguiente:

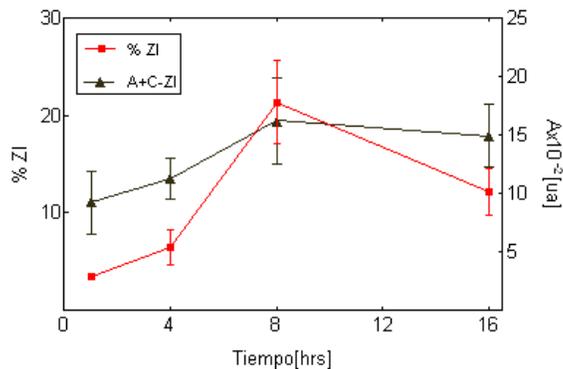


Figura 5.23: Gráfica que muestra el transcurso temporal tanto de la cantidad relativa de RL y centros paramagnéticos con el porcentaje de infarto.

Existe evidentemente una correlación directa entre estos. En la ZI la disminución o interrupción de FSC desencadena una disminución de O_2 , esto implica una gran inestabilidad en las moléculas, lo que a su vez nos indica que para estabilizarse se activan numerosas reacciones químicas en donde los electrones juegan un papel muy importante. Como se sabe la producción de los RL más comunes son los que están relacionados con el O_2 . Esto es, la falta de O_2 conlleva a la producción excesiva de RL.

Capítulo 6

Conclusiones

En los espectros RPE de tejido cerebral de ratas Wistar se detectaron dos señales principales. La señal A corresponde a *hemo-nitrosil* (NO-Fe²⁺), asignada a la interacción dipolo-dipolo de un RL con un metal cuyos valores espectroscópicos calculados son $2,0077 \pm 0,0001$; $2,0079 \pm 0,0007$ y $2,0082 \pm 0,0015$ para HL, HR y ZI respectivamente. La señal C cuyo valor espectroscópico $g \approx 2$, es debida a la presencia de RL presentes en las muestras debido a las reacciones bioquímicas *in vivo* que tienen lugar en las células.

Los espectros RPE de plasma mostraron la detección de dos señales principales cuyo significado es el mismo que el de las señales expuestas arriba (ventana cerrada). Los espectros RPE de este mismo tipo de muestras obtenidos a ventana abierta presentaron dos señales: una cuyo ancho de línea es $\Gamma = 10,25 \pm 1,17$ mT típica de Fe³⁺ de alto espín (S=5/2). La otra interpretada como la composición de las señales A y C detectadas a ventana cerrada.

Los espectros RPE obtenidos de las muestras de tejido cerebral y plasma, mostraron que existe una dependencia temporal en la IC con la producción excesiva de RL y especies paramagnéticas. Esta dependencia puede ser observada en las diferencias de las intensidades relativas de las señales detectadas así como también en sus cantidades relativas.

Los cambios en la producción excesiva de RL una vez producida la IC,- cambios en el curso temporal de especies paramagnéticas y RL-, con los daños neurofisiológicos están correlacionados. A las 4 horas producida la IC el daño neurológico es máximo.

En el estudio de las muestras de tejido cerebral por pruebas bioquímicas se observó que los niveles de SOD se reflejan con la cantidad relativa de RL y especies paramagnéticas. En general la disminución de los niveles de SOD, MAD y la concentración relativa de *hemo-nitrosil* como el incremento de la cantidad relativa RL constituyen el fundamento para afirmar que existe una correlación de los resultados obtenidos por RPE y pruebas bioquímicas,-las cuales son utilizadas por los médicos para evaluar el estrés oxidativo-.

Al estudiar los valores de los volúmenes para la zona de infarto se observó el valor máximo a las 8 horas y mínimo a la primera hora en el curso temporal de la IC. A las 8 horas el porcentaje de infarto fue máximo y el porcentaje de edema mínimo. Se vio que el porcentaje de infarto con la producción excesiva de RL están directamente correlacionados.

Es de valiosa contribución el aporte conferido por el estudio RPE a la medicina,- los resultados hallados en este tipo de estudio no pueden observarse con ninguna otra técnica-, ya que se encontró el papel que juega el estrés oxidativo en la IC. Una vez entendido el papel de los RL en la IC, la parte médica y química podrían proponer el uso o no de AO que bajo ciertas condiciones actúen como tratamiento en las enfermedades cerebrovasculares.

Es necesario medir, en ambos hemisferios la actividad de otras enzimas antioxidantes. Si bien los antioxidantes se han recomendado como una garantía en el tratamiento de AVC, los resultados, indicaron que el uso de fármacos puede ser peligroso porque reduciría el estímulo oxidativo de la defensa antioxidante endógeno.

Apéndice A

Teoría de RPE

Para que un sistema manifieste el fenómeno de resonancia paramagnética, debe estar integrado por partículas que posean un momento magnético y/o un momento angular. Núcleos y electrones satisfacen este requerimiento [59].

La espectroscopia de RPE es un método, descubierto en 1944 por E.K. Zavoiski, la cual emplea un campo magnético externo simultáneamente con la irradiación de microondas [50].

A.1. Principio básico de RPE

El movimiento orbital electrónico es la fuente de un momento magnético en el átomo, que resulta directamente del momento angular \vec{L} , de la carga. Además, el electrón tiene un momento magnético intrínseco conocido como espín electrónico cuyo operador correspondiente está dado por:

$$\hat{\mu}_s = -g_e\beta_e\hat{S} \quad (\text{A.1})$$

El factor $g_e\beta_e = \gamma$ es la relación giromagnética, β_e es el magnetón de Bohr definido como $\beta_e = \frac{e\hbar}{2m_e} = 9,27400899E^{-24}$ J/T, donde e y m_e son la carga y la masa del electrón respectivamente. Al factor g_e se le denomina factor- g del electrón libre y su valor es 2,0023.

Un átomo o molécula poseerá un momento dipolar magnético permanente sólo si tiene un momento angular electrónico total distinto de cero, es decir, el momento magnético del átomo o molécula depende de la forma en que se componen los momentos magnéticos de los electrones. Cuando se produce un momento magnético resultante, puede deberse al movimiento orbital, al espín o ambos.

En términos clásicos, la energía de un momento dipolar magnético $\vec{\mu}$ en un campo magnético externo \vec{B} está dada por la ecuación (A.2).

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (\text{A.2})$$

Por el principio de correspondencia para un sistema mecano-cuántico reemplazamos $\vec{\mu}$ por el operador apropiado dado por la ecuación (A.1) para obtener el hamiltoniano para un electrón libre en un campo magnético externo.

$$H = -\hat{\mu}_s \cdot \vec{B} = g_e \beta_e \hat{S}_z \cdot \vec{B} \quad (\text{A.3})$$

Si el campo \vec{B} sigue la dirección z, el hamiltoniano donde hemos introducido B_o por la magnitud de \mathbf{B} será:

$$H = g_e \beta_e \hat{S}_z B_o \quad (\text{A.4})$$

el único operador en el segundo miembro de la ecuación (A.4) es \hat{S}_z y por tanto, los valores propios del hamiltoniano son simples múltiplos de los valores propios de éste.

$$E = g_e \beta_e B_o m_s \quad (\text{A.5})$$

Para $m_s = \pm 1/2$ hay dos estados degenerados en campo cero y cuya separación aumenta linealmente con B_o (Efecto Zeeman).

La RPE se efectúa con las transiciones inducidas entre niveles de energía (niveles Zeeman) de un sistema paramagnético situado en un campo magnético externo. Estas transiciones ocurren entre dichos niveles si la muestra es irradiada con un campo electromagnético cuya energía (de frecuencia ν) iguala la diferencia de energía entre los niveles desdoblados.

Una transición ΔE puede ser inducida entre estos niveles aplicando un campo electromagnético oscilante B_1 (de frecuencia ν) perpendicular a B_o tal que se cumpla la llamada ecuación de resonancia para un electrón libre dada por la expresión:

$$\Delta E = h\nu = g_e \beta_e B_o \quad (\text{A.6})$$

donde ΔE es la energía de la absorción resonante, h es la constante de Planck, ν es la frecuencia de microondas, g_e es el factor espectroscópico el cual es una característica de un centro paramagnético dado, B_o es el campo magnético en el cual la resonancia ocurre (véase fig. A.1) [52].

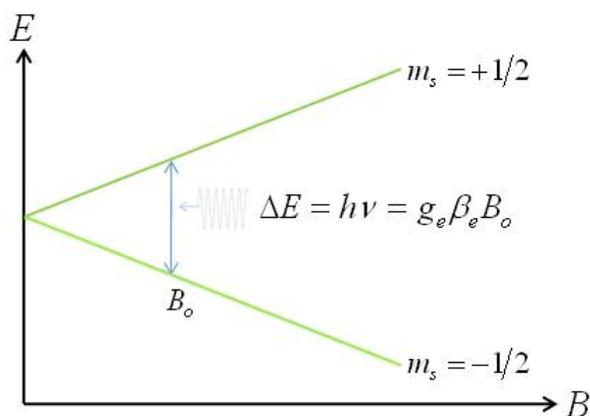


Figura A.1: Desdoblamiento Zeeman de un sistema $S=1/2$.

El factor espectroscópico g puede proporcionar información importante sobre la distribución de densidad del electrón y la geometría del sistema paramagnético. Por consiguiente, si \vec{g} es un tensor hay tres factores principales de él: g_{xx} , g_{yy} y g_{zz} .

Por electrónica y para mayor resolución, los espectros que obtenemos son la primera derivada de la absorción. Otros parámetros importantes de RPE son la forma y la anchura de la línea espectral así como la estructura hiperfina y superfina de los espectros. El área bajo la curva de absorción es proporcional a la cantidad relativa de centros paramagnéticos resonando en la cavidad [10, 50, 59].

A.2. Hamiltoniano de espín

En un ion paramagnético, sus niveles de energía son discretos. Estos niveles energéticos son los valores propios del operador hamiltoniano los cuales representan la energía electrónica total del ion.

La energía de cada nivel dependerá de las propiedades del ion (tales como carga eléctrica, masa, número atómico, entre otras), el efecto del campo cristalino y el campo magnético aplicado, junto con las interacciones nucleares. Con todos estos términos, se tiene un método formal para describir la energía en términos de un número pequeño de parámetros, los cuales se hallan experimentalmente.

La interpretación de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se efectúa considerando el hamiltoniano de espín que describe al sistema dado por:

$$\hat{H} = \beta \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{B} + \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} + \vec{S} \cdot \vec{D} \cdot \vec{S} \quad (\text{A.7})$$

donde el primer término se refiere a la interacción Zeeman electrónica, el segundo término representa la interacción hiperfina y el tercero se refiere al campo cristalino. Donde \vec{g} (término espectroscópico), \vec{A} (término interacción hiperfina) y \vec{D} (término campo cristalino) son tensores de tercer orden.

Las interacciones magnéticas son anisotrópicas en general y por lo tanto, son descritas por cantidades tensoriales, este es el caso del momento magnético de espín anisotrópico de cada electrón, su propiedad de anisotropía está medida por el factor espectroscópico \vec{g} (tensor).

A.3. Término Zeeman electrónico

La expresión más general que representa la interacción Zeeman entre un campo magnético externo \vec{B} y el espín electrónico es:

$$H_{Ze} = \beta_e \vec{S} \cdot \vec{g}_e \cdot \vec{B} \quad (\text{A.8})$$

donde \vec{B} y \vec{S} son los vectores de campo magnético externo y de espín electrónico, \vec{g}_e es un tensor. La expresión $\vec{S} \cdot \vec{g}_e \cdot \vec{B}$ puede ser escrita en forma matricial como:

$$[S_x \quad S_y \quad S_z] \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} B_x \\ B_y \\ B_z \end{bmatrix} \quad (\text{A.9})$$

donde $B_x, B_y, B_z, S_x, S_y, S_z$ son las tres componentes escalares de los valores \vec{B} y \vec{S} , definidos en términos de un sistema de ejes X, Y y Z fijo en la molécula.

Cuando $g_z = g_y = g_x$, la señal es llamada isotrópica e indicativo de la simetría esférica (algunas veces característico de radicales orgánicos) [50]. Cuando $g_{xx} = g_{yy}(g_{\perp}) \neq g_{zz}(g_{\parallel})$, el sistema es de simetría axial, y cuando $g_{zz} \neq g_{yy} \neq g_{xx}$ el sistema es de simetría rómbica.

El factor \vec{g} es muchas veces simétrico, es decir, $g_{xy} = g_{yx}, \dots, g_{zy} = g_{yz}$. Por lo tanto \vec{g} tiene asociado una matriz simétrica, la cual puede ser diagonalizada por medio de una matriz apropiada de transformación:

$$MgM^{-1} = g(\text{diagonal}) \quad (\text{A.10})$$

La transformación corresponde a una reorientación de los ejes y la matriz de transformación M define la orientación de los nuevos ejes principales con respecto a los anteriores. En el nuevo sistema de referencia que diagonaliza al tensor \vec{g} , el hamiltoniano Zeeman se escribe como

$$H_{Ze} = \beta_e(g_{xx}B_xS_x + g_{yy}B_yS_y + g_{zz}B_zS_z) \quad (\text{A.11})$$

las componentes de \vec{g} (g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}) miden la componente de momento magnético en la dirección XX, YY y ZZ del campo magnético. El átomo de hidrógeno posee simetría esférica; el hamiltoniano de espín tiene su factor espectroscópico isotrópico para el electrón y una interacción hiperfina entre el electrón y su núcleo (factor \mathbf{A}). En la mayoría de las moléculas, estas cantidades varían con la dirección del campo magnético aplicado y el hamiltoniano de espín es anisotrópico.

A.4. Término de interacción hiperfina

Por interacción hiperfina se entiende la interacción de los electrones desapareados con el momento magnético de su núcleo. Existen dos tipos de interacción hiperfina, el primer tipo es la interacción clásica de dos dipolos μ_S y μ_I separados una distancia r . Esta interacción (anisotrópica) dipolar magnética, depende fuertemente del ángulo entre la línea que une a los dos dipolos y el campo externo (fig. A.2).

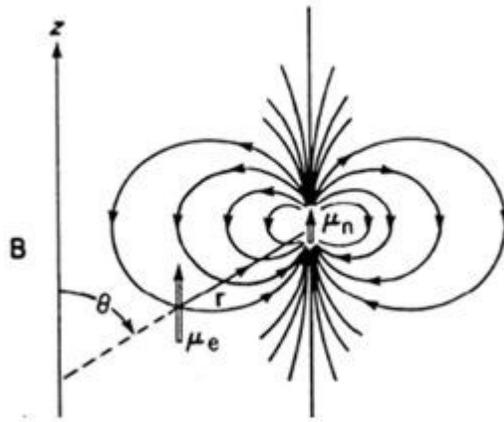


Figura A.2: Interacción dipolar magnética entre $\mu_S(\mu_e)$ y $\mu_N(\mu_I)$.

La energía de interacción clásica entre dos dipolos magnéticos μ_S y μ_I separados una distancia r está dada por la ecuación (A.12).

$$E_{dip} = \frac{\boldsymbol{\mu}_S \cdot \boldsymbol{\mu}_I}{r^3} - \frac{3(\boldsymbol{\mu}_S \cdot \mathbf{r})(\boldsymbol{\mu}_I \cdot \mathbf{r})}{r^5} \quad (\text{A.12})$$

Por el principio de correspondencia, el hamiltoniano cuántico para esta interacción está dado por la ecuación (A.13).

$$H_{dip} = g_e \beta_e g_N \beta_N \left[\frac{\boldsymbol{\mu}_S \cdot \boldsymbol{\mu}_I}{r^3} - \frac{3(\boldsymbol{\mu}_S \cdot \mathbf{r})(\boldsymbol{\mu}_I \cdot \mathbf{r})}{r^5} \right] \quad (\text{A.13})$$

La segunda interacción no es clásica y proviene de la probabilidad distinta de cero de encontrar al electrón en la región nuclear ($0 \leq r \leq a_o$), a_o es el radio de Bohr. Fermi demostró que esta interacción es isotrópica y es llamada interacción de contacto o interacción de Fermi, la cual está dada por:

$$H_{Fermi} = \frac{8}{3} \boldsymbol{\mu}_S \cdot \boldsymbol{\mu}_I |\Psi(0)|^2 \quad (\text{A.14})$$

donde $\Psi(0)$ es la función de onda electrónica evaluada en el núcleo.

Si la molécula contiene uno ó más núcleos vecinos al electrón desapareado con un momento dipolar magnético, debido a la interacción de cada núcleo con el momento magnético electrónico resulta un desdoblamiento superhiperfino de los niveles de energía magnéticos del electrón desapareado (aún cuando no se haya aplicado un campo magnético externo).

Cuando las condiciones son favorables, esta interacción se manifiesta en que cada línea se desdobra en un multiplete de $(2I+1)$ líneas, donde I es el espín del núcleo vecino responsable de la interacción.

La contribución de la interacción hiperfina al hamiltoniano de espín, es la suma de los términos de interacción dipolar y de contacto de Fermi dada como:

$$H_{hf} = g_e \beta_e g_I \beta_I \left[\frac{\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}}{r^3} + \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^5} + \frac{8\pi}{3} \delta(r) \mathbf{S} \cdot \mathbf{I} \right] \quad (\text{A.15})$$

donde el tercer término es la interacción de contacto (o de Fermi).

A.5. Término de campo cristalino

La teoría del campo cristalino tiene su inicio con el artículo de Bethe en 1929, pero no fue sino hasta los años cincuenta que empezó a aplicarse a problemas químicos.

En la estructura atómica donde los electrones sucesivamente van llenando orbitales $1s$ $2s$ $2p$ $3s$ $3p$ $3s$ $3d$...etc., los elementos llamados metales de transición del bloque d (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni y Zn) son los primeros en llenar los niveles $3d$ y tienen la particularidad de que algunos de ellos son paramagnéticos pues llenan sólo parcialmente los niveles $3d_{+2}$, $3d_{+1}$, $3d_0$, $3d_{-1}$ y $3d_{-2}$, -los subíndices indican los valores que toma el número cuántico magnético m -. En la notación de coordenadas cartesianas éstos son: d_{xy} , d_{yz} , d_{zx} , $d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2} (fig. A.3).

En el contexto de teoría de grupos, los orbitales d_{xy} , d_{xz} y d_{yz} , son llamados t_{2g} ; d_{z^2} y $d_{x^2-y^2}$ son llamados e_g .

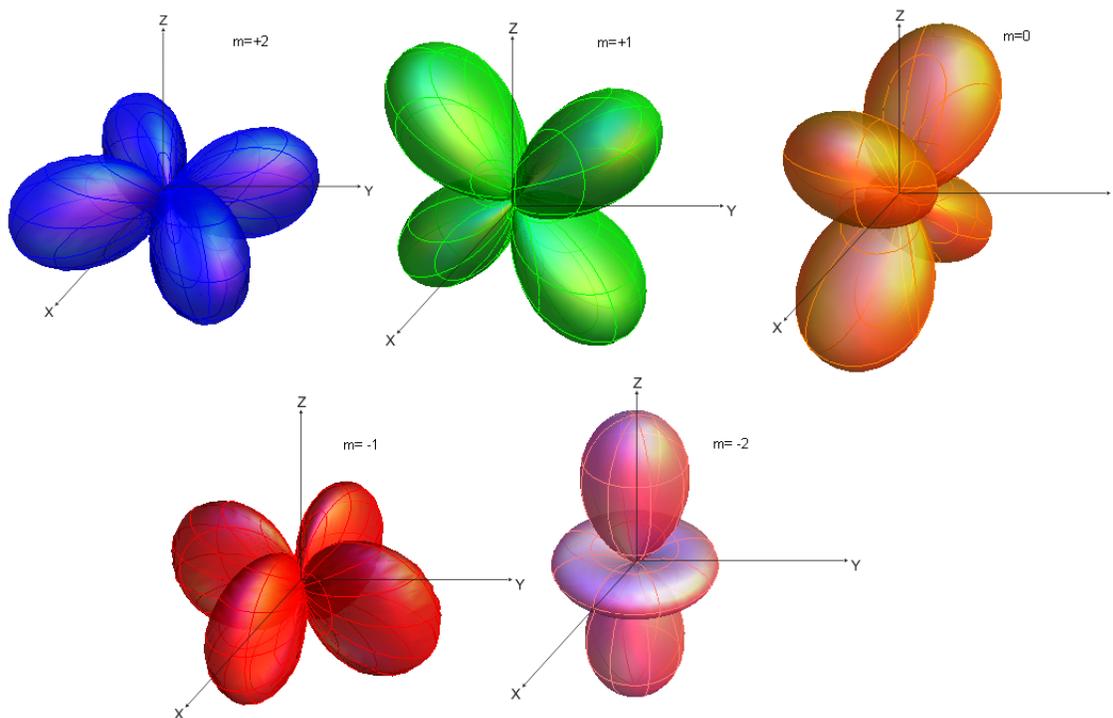


Figura A.3: Parte angular de las funciones de onda (orbitales) de un electrón $3d$.

En un ion libre la energía de los cinco orbitales d es la misma, es decir, el estado base es degenerado de orden 5. Sin embargo cuando el ion metálico forma parte de una molécula, en el compuesto está enlazado a otros átomos.

La teoría de campo cristalino supone que el ion paramagnético reside en un campo eléctrico cristalino cuyas fuentes son cargas puntuales (de los átomos ligados) en el sitio de los ligantes. Esta suposición electrostática es grandemente aproximada al no considerar los orbitales moleculares de los ligantes.

Si se quiere aplicar esta teoría al Fe, se deben de considerar los electrones de la capa semillena 3d. Estos electrones son los que están involucrados en las reacciones de óxido-reducción descrita por la ecuación (A.16).



Para la discusión de las propiedades del ion Fe, son fundamentales las densidades electrónicas, es decir, las funciones de onda. El conocimiento de las propiedades del Fe es crucial en el entendimiento de la función de los compuestos que lo contienen, tales como las hemoproteínas. El punto importante del campo cristalino es que el efecto del ambiente cristalino no es el mismo sobre todos los orbitales d y por lo tanto se rompe la degeneración de los cinco orbitales.

El desdoblamiento de los niveles de energía degenerados del ion es muy sensible a la simetría de su alrededor. Usualmente para un ion en la geometría de un octaedro regular cuyos vértices representan los ligantes cargados negativamente, una pequeña perturbación a estos ligantes, provocará grandes cambios en su disposición original. En primera aproximación este modelo puede explicar el problema del grupo hemo satisfactoriamente como en la hemoglobina y la mioglobina.

Colocando al ion metálico con sus cinco electrones d en el centro de un octaedro de carga negativa (ver fig. A.4), el origen del desdoblamiento es claro. Los tres orbitales t_{2g} (d_{xy} , d_{yz} , d_{zx}) están evitando los vértices del octaédro, mientras que los orbitales e_g ($d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2}) están apuntado directamente hacia las cargas negativas. Esto le costará (a los orbitales) una energía repulsiva de Coulomb y consecuentemente tendrán una energía más alta. La diferencia de energía entre los orbitales t_{2g} y e_g , es el parámetro Δ llamado de desdoblamiento de campo cristalino. Este valor depende de cada compuesto; en hemo proteínas es del orden de 10^4 cm^{-1} [55].

En la medida que se perturba el octaedro regular al aplicar una distorsión tetragonal (ver fig. A.4), la degeneración de los orbitales t_{2g} y e_g sufren un desdoblamiento adicional. Esto es debido al hecho que la distorsión mueve las cargas negativas con respecto del ion central a lo largo de la dirección z y por tanto, reduce la energía

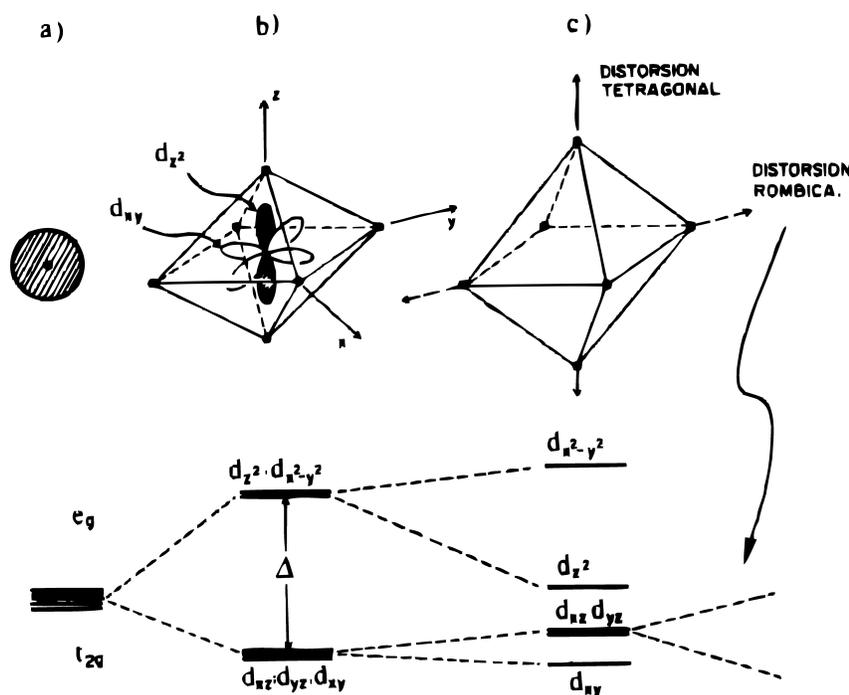


Figura A.4: El efecto del campo cristalino sobre los niveles de energía de los orbitales d: a) ion metálico libre simetría esférica, b) geometría octaédrica, c) octaédro con distorsión.

repulsiva entre estas cargas y los orbitales que están dirigidos a lo largo de la dirección z . De aquí, se espera una disminución en la energía del orbital d_{z^2} y un desdoblamiento adicional del orbital d_{xy} , mientras que los orbitales d_{xz} y d_{yz} se mantienen degenerados. Al introducir una distorsión rómbica (ver flechas punteadas en la fig. A.4c) la distancia de separación no es equivalente con respecto a los ejes x y y y los orbitales d_{xz} y d_{yz} son desdoblados.

Habiendo establecido el orden de los niveles de energía, se debe decidir como se deben distribuir los electrones en ellos. En el caso de ion libre y por el balance de energías, el arreglo de electrones maximiza el espín total (regla de Hund)¹.

El Fe^{2+} tiene seis electrones en la capa d (6 d-electrones), mientras que el Fe^{3+} tiene 5 d-electrones los cuales deben estar acomodados en los niveles de energía.

¹Esto es una consecuencia del principio de exclusión de Pauli cuyos estados tienen electrones equivalentes con espines apuntando en la misma dirección tienden a ser especialmente separados. Su repulsión se reduce y así su energía es más baja.

Tabla A.1: Valores posibles de espín en complejos Fe^{2+} y Fe^{3+} .

	ESPIN ALTO (campo bajo)	ESPIN INTERMEDIO	ESPIN BAJO (campo alto)
5 d-electrones Fe^{3+}	S=5/2 $\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$	S=3/2 $\uparrow \uparrow \uparrow$	S=1/2 $\uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow$
6 d-electrones Fe^{2+}	S=2 $\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$	S=1 $\uparrow \uparrow \uparrow$	S=0 $\uparrow \downarrow \uparrow \downarrow \uparrow \downarrow$

En un complejo octaédrico regular, los primeros tres electrones pueden ser puestos con espines paralelos en los orbitales t_{2g} (ver fig. A.4b). Si el cuarto electrón, con su espín paralelo al de los otros tres, es puesto en un orbital e_g se gana energía de intercambio de espín, pero cuesta aproximadamente la energía Δ para hacerlo, si esto es energéticamente conveniente o no depende del valor de Δ .

Si Δ es muy grande, se habla del caso de campo cristalino fuerte en el cual los orbitales t_{2g} están llenos al máximo, resultando un compuesto espín bajo. Para valores pequeños de Δ , se tiene el régimen de campo cristalino débil y resultando un compuesto de espín alto. Cuando el octaedro regular es distorsionado (fig. A.4c) el orbital d_{z^2} puede acercarse a los orbitales t_{2g} obteniéndose cuatro orbitales a energía relativamente baja. En este caso, uno obtiene complejos con un valor de espín intermedio. Los posibles valores de espín para el Fe^{2+} y Fe^{3+} son mostrados en la tabla A.1.

El efecto del campo eléctrico de los ligantes sobre ion paramagnético Fe (o cualquier otro metal) es el de desdoblar los niveles de energía a campo magnético cero, llamado efecto Stark [52].

Apéndice B

Modelo matemático para el cálculo de volúmenes

B.1. Introducción

Un accidente cerebrovascular isquémico (ACI) ocurre cuando una arteria que suministra sangre al cerebro queda bloqueada reduciendo repentinamente o interrumpiendo el flujo sanguíneo cerebral (FSC) [60]. Esta interrupción o disminución en un territorio vascular determinado genera un área de infarto.

Mediante la oclusión de la arteria cerebral media derecha (OACM) en ratas macho Wistar es producida isquemia cerebral (IC). Sacrificadas después de un número de horas su cerebro es extraído, rebanado y teñido con tetrazolio rojo. Con esto último, es posible observar de manera directa la zona de infarto (ZI).

En el presente estudio nuestro interés radica en determinar el valor del volumen total de la ZI, del hemisferio izquierdo (HL) y derecho (HR). Para ello, se propone un modelo matemático en el cual es necesario considerar las restricciones obtenidas de manera experimental. El buen uso para la determinación de una función que mejor represente a las mediciones experimentales de una variable con respecto a otra es utilizado, una vez que se han identificado las variables dependientes e independientes. Además de esto, la aplicación de un criterio estadístico y el conocimiento previo de los volúmenes totales con otros grupos de animales sometidos a las mismas condiciones experimentales juegan un papel muy importante. En este trabajo se propone un modelo matemático que nos proporciona de forma cuantitativa los valores aproximados de los volúmenes de interés.

B.2. Metodología

Producida la IC en ratas macho Wistar el cerebro es extraído y posteriormente rebanado en una matriz cerebral, colocando navajas cada 2mm en las subdivisiones contenidas en dos partes laterales de este. Las rebanadas extraídas son pigmentadas con tetrazolio rojo, una vez agrupadas y ordenadas son digitalizadas con una cámara. El software ImageJ Launcher es usado para calcular las áreas de la ZI, HL y HR utilizando las imágenes obtenidas.

Por otra parte, matemáticamente el volumen total puede expresarse como:

$$V_{T_i} = \sum_{j=1}^6 V_j = \sum_{j=1}^k V_j + \sum_{j>k}^6 V_j \quad (\text{B.1})$$

V_j se refiere al volumen de la j-ésima rebana e $i = \text{HL, HR y ZI}$. El límite superior de la sumatoria es considerado a partir de las muestras obtenidas experimentalmente. El V_j es calculado mediante la ecuación:

$$V_j = V_{a_j} + V_{r_j} = A_{a_j} \cdot w_{a_j} + A_{r_j} \cdot w_{r_j} \quad (\text{B.2})$$

donde V_{a_j} y V_{r_j} son el volumen anverso y reverso respectivamente de la j-ésima rebanada, A es el área y w el espesor. Considerando $w_{a_j} = w_{r_j} = 1\text{mm}$ obtenemos $w_{a_j} + w_{r_j} = 2\text{mm}$ (condición experimental). De las ecuaciones (B.1) y (B.2) se puede observar que si son conocidas las áreas j-ésimas entonces el volumen total puede ser calculado fácilmente.

B.3. Fundamentación

Experimentalmente para este tipo de estudio (de volúmenes) no es posible el uso de todas las rebanadas, ya que también muestras de tejido cerebral son utilizadas para el estudio de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE) y pruebas bioquímicas tales como determinación proteínas, superóxido dismutasa (SOD), malondialdehído (MDA) y carbonilo. Por esta razón surge la necesidad de construir un modelo matemático que nos permita calcular V_{T_i} con sólo conocer k-rebanas del cerebro de cada animal.

Para la construcción de este modelo se consideraron 4 grupos de animales (n=20) a los que se indujo IC, - a estos grupos lo llamaremos grupo φ -, los cuales fueron

sacrificados después de 18 horas¹. Para el grupo φ , $k=6$ por lo tanto los valores de los volúmenes totales son determinados, es decir que, los dos sumandos de la ecuación (B.1) son conocidos.

Experimentalmente $k=3$, al escribir esta restricción en la ecuación (B.1) denotamos el primer término como V_{3R} . En este caso el segundo término de dicha ecuación es desconocida. Por lo tanto, deseamos encontrar una función f tal que:

$$V_{T_i} = f(V_{3R}) \quad (\text{B.3})$$

de modo que el modelo matemático propuesto es:

$$V_{T_i}(V_{3R}) = V_{T_i}(V_{3R}, a_1, \dots, a_m) \quad (\text{B.4})$$

Los V_{3R} y V_{T_i} del grupo φ son considerados para la determinación de las funciones buscadas, utilizando el método de ajuste por mínimos cuadrados.

B.3.1. Aproximación a la función

Si suponemos que la forma del infarto es aproximadamente una sección de la cuarta parte de un elipsoide (fig. B.1a), hallaremos que la función que buscamos es aproximadamente un polinomio de orden uno. El volumen de la sección es:

$$V_{T_{ZI}} = \frac{\pi}{3}abc \quad (\text{B.5})$$

donde a, b y c son las longitudes de los semiejes del elipsoide. La forma de las tres primeras rebanadas se aproxima a la mostrada en la fig. (B.1b). A partir de esta no es difícil determinar que:

$$V_{3R} = \iiint_R dV = \frac{\pi}{3}bc \left(\frac{3ah^2 - h^3}{4a^3} \right) \quad (\text{B.6})$$

Por lo tanto:

$$V_{T_{ZI}} = f(V_{3R}) = \frac{4a^4}{3ah^2 - h^3} V_{3R} \quad (\text{B.7})$$

¹Para grupos que difieren en tiempo al del grupo φ la justificación para consideración a pesar de esta diferencia es la siguiente: anatómicamente hay una arteria que se ocluye esta sigue un recorrido que va hacia la parte anterior del cerebro, al ocluirlo producimos IC y muerte de tejido esto sigue un curso temporal, sólo que crecerá o decrecerá. Pero esto se verá precisamente en las primeras rebanas porque el infarto está en la parte anterior del cerebro.

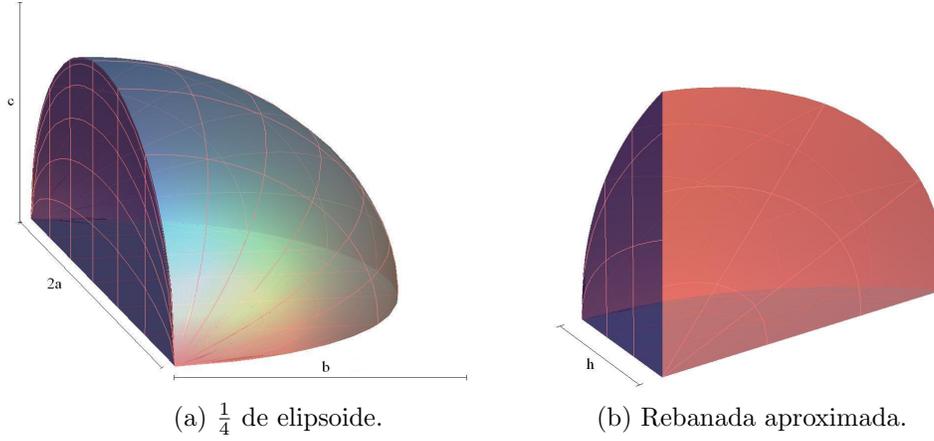


Figura B.1: Esquema de las formas aproximadas.

De esta expresión se puede observar que la dependencia de V_{T_i} en V_{3R} es aproximadamente lineal. Que era lo que se quería demostrar teóricamente. Experimentalmente para determinar el valor de las constantes utilizamos el método de ajuste por mínimos cuadrados.

En seguida se demostrará como se llegó a las ecuaciones (B.6) y (B.7). Considérese un elipsoide centrado en el origen y semiejes a, b y c . Nuestro objetivo (ecuación B.12) es obtener la medida de la región determinada por el sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} + \frac{z^2}{c^2} &= 1, \\ a - h &\leq x \leq a, \\ 0 &\leq y, \\ 0 &\leq z, \end{aligned} \tag{B.8}$$

donde $0 \leq h \leq 2a$ es fijo (la región es ilustrada en la fig. B.2). En efecto, podemos calcular

$$V_{3R} = \iiint_R dx dy dz \tag{B.9}$$

con $R = \{(x, y, z) \in \mathbb{R} : x, y, z \text{ satisfacen (B.8)}\}$, para hacer esto hacemos una reparametrización de (B.8).

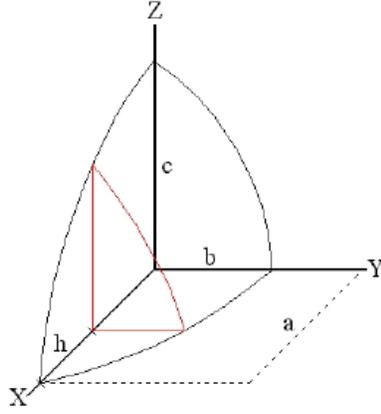


Figura B.2: La sección determinada por el sistema (B.8), a partir de las líneas rojas hasta el frente.

Supóngase que x es fijo, entonces y y z se encuentran en una cuarta parte de la elipsoide (en el plano $X = x$)

$$\frac{y^2}{b^2} + \frac{z^2}{c^2} = 1 - \frac{x^2}{a^2}, \quad (\text{B.10})$$

los cuales pueden ser parametrizados por

$$\begin{aligned} y &= Br \cos(\theta) & 0 \leq r \leq 1 \\ z &= Cr \sin(\theta) & 0 \leq \theta \leq \pi/2 \end{aligned}$$

donde $B = B(x)$ y $C = C(x)$ son los semiejes del elipsoide, estos están dados por

$$B(x) = b \sqrt{1 - \frac{x^2}{a^2}}, \quad C(x) = c \sqrt{1 - \frac{x^2}{a^2}},$$

esto es debido a que son los únicos números positivos para que $(x, B(x), 0)$ y $(x, 0, C(x))$ satisfagan la ecuación (B.10). Entonces, obtenemos la parametrización

$$\begin{aligned} x &= x & a - h \leq x \leq a \\ y &= B(x)r \cos(\theta) & 0 \leq r \leq 1 \\ z &= C(x)r \sin(\theta) & 0 \leq \theta \leq \pi/2 \end{aligned} \quad (\text{B.11})$$

con esto obtenemos de la definición de V_{3R} que

$$V_{3R} = \int_{a-h}^a \int_0^{\pi/2} \int_0^1 J(r, \theta, x) dr d\theta dx$$

donde $J(r, \theta, x)$ es el determinante Jacobiano definido por

$$J(r, \theta, x) = \begin{vmatrix} \frac{\partial x}{\partial x} & \frac{\partial x}{\partial r} & \frac{\partial x}{\partial \theta} \\ \frac{\partial y}{\partial x} & \frac{\partial y}{\partial r} & \frac{\partial y}{\partial \theta} \\ \frac{\partial z}{\partial x} & \frac{\partial z}{\partial r} & \frac{\partial z}{\partial \theta} \end{vmatrix},$$

en este caso obtenemos de la ecuación (B.11)

$$\begin{aligned} J(r, \theta, x) &= \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 \\ r \cos(\theta) \frac{\partial B(x)}{\partial x} & B(x) \cos(\theta) & -B(x) r \sin(\theta) \\ r \sin(\theta) \frac{\partial C(x)}{\partial x} & C(x) \sin(\theta) & C(x) r \cos(\theta) \end{vmatrix} \\ &= B(x) C(x) r \\ &= bcr \left(1 - \frac{x^2}{a^2} \right) \\ \Rightarrow V_{3R} &= bc \int_{a-h}^a \int_0^{\pi/2} \int_0^1 r \left(1 - \frac{x^2}{a^2} \right) dr d\theta dx \\ &= bc \left(\int_0^{\pi/2} d\theta \right) \left(\int_0^1 r dr \right) \left(\int_{a-h}^a \left(1 - \frac{x^2}{a^2} \right) dx \right) \end{aligned}$$

finalmente concluimos que

$$V_{3R} = \frac{\pi}{3} bc \left(\frac{3ah^2 - h^3}{4a^3} \right). \quad (\text{B.12})$$

Al despejar el producto bc de ésta última ecuación y al sustituirlo en la ecuación (B.5) obtenemos (B.7).²

B.4. Resultados

Las funciones para HL, HR y ZI se obtuvieron al haber propuesto un ajuste lineal a las gráficas que tienen como valores independientes los valores V_{3R} y como dependientes a V_T . Se propone este ajuste por lo siguiente: se observó que al elegir la

²La contribución de ésta subsección fue hecha por el LFM Héctor Hugo Corrales Sánchez, actualmente estudiante de la Maestría en Matemáticas en el CINVESTAV-México.

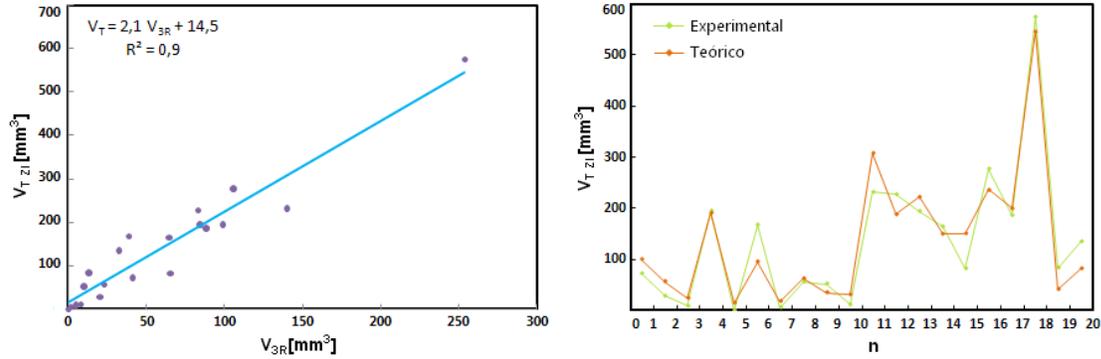


Figura B.3: Función propuesta para la ZI.

curva que mejor represente a los datos obtenidos experimentalmente implica que el orden del polinomio aumente ($n \geq 1$) así como el valor de R^2 . Lo anterior no garantiza que el grado de correlación sea lineal. Por ejemplo supongamos que el ajuste sea de un polinomio de orden 4 cuyo R^2 es muy próximo a 1, en primera instancia podríamos pensar que hemos encontrado la curva y por lo tanto la función que deseamos conocer. Supongamos que esto es cierto, entonces obtenida la forma explícita de la función al evaluar en un punto V_{3R} deberíamos de obtener un valor aproximado al V_T (que es conocido), lo que no resulta algunos valores se aproximan pero otros divergen. Por lo tanto, no son suficientes los criterios mencionados anteriormente, aún falta algo más. Es claro que el conocimiento de los V_T nos impone cierta restricción, que se resume en un tipo de cota superior e inferior de los valores de V_T . Finalmente hallamos que las funciones que cumplen con éstas restricciones son las funciones lineales. El ajuste para la función ZI es mostrado en la fig.B.1.

En la tabla B.1 se muestra las funciones propuestas las cuales componen el modelo matemático.

Tabla B.1: Funciones propuestas para la determinación de los volúmenes.

Nombre	Función
HL	$2,3 v_{3R} + 77,8$
HR	$2,3 v_{3R} + 87,7$
ZI	$2,1 v_{3R} + 14,5$

En la figura B.3 se muestra los comportamientos de los valores experimentales y los obtenidos aplicando el modelo matemático para la ZI. Esto se hace para corroborar que las funciones propuestas muestren comportamientos semejantes a los experimentales.

B.5. Conclusiones

Un modelo matemático se propuso a través de los resultados experimentales previos de grupos bajo las mismas condiciones clínicas. Este se hizo mediante el método de ajuste por mínimos cuadrados y se aplicó a los grupos de estudio del presente trabajo. Para investigaciones cuyo interés sea el de los cambios del volumen de los hemisferios y el de la zona de infarto en IC , -en ratas macho Wistar a las que se les induce IC por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)-, el modelo puede ser aplicado. En los cuales sólo es posible obtener una parte del cerebro de cada animal.

Apéndice C

Curso temporal de espectros RPE

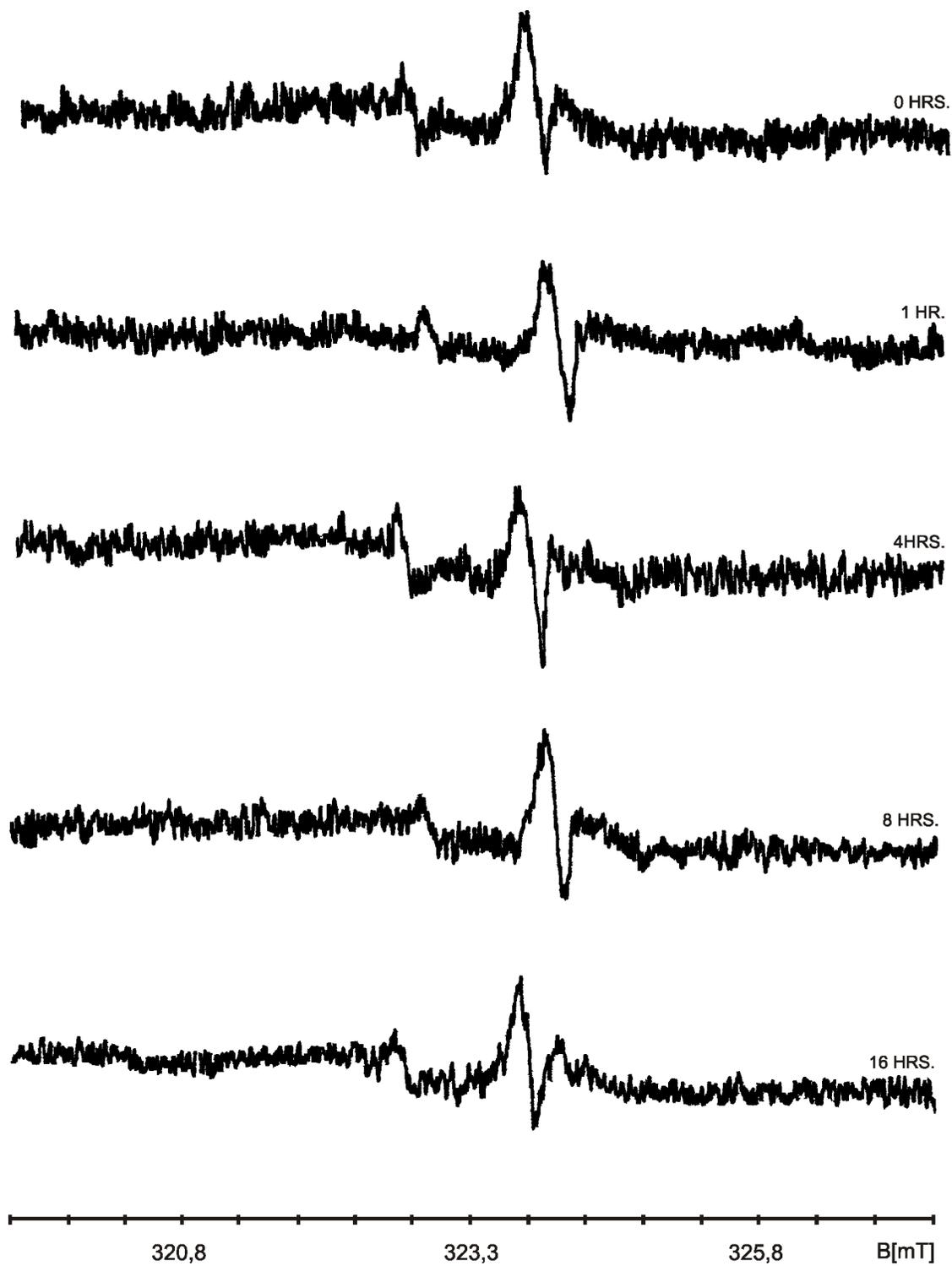


Figura C.1: Curso temporal de los espectros RPE para el HL.

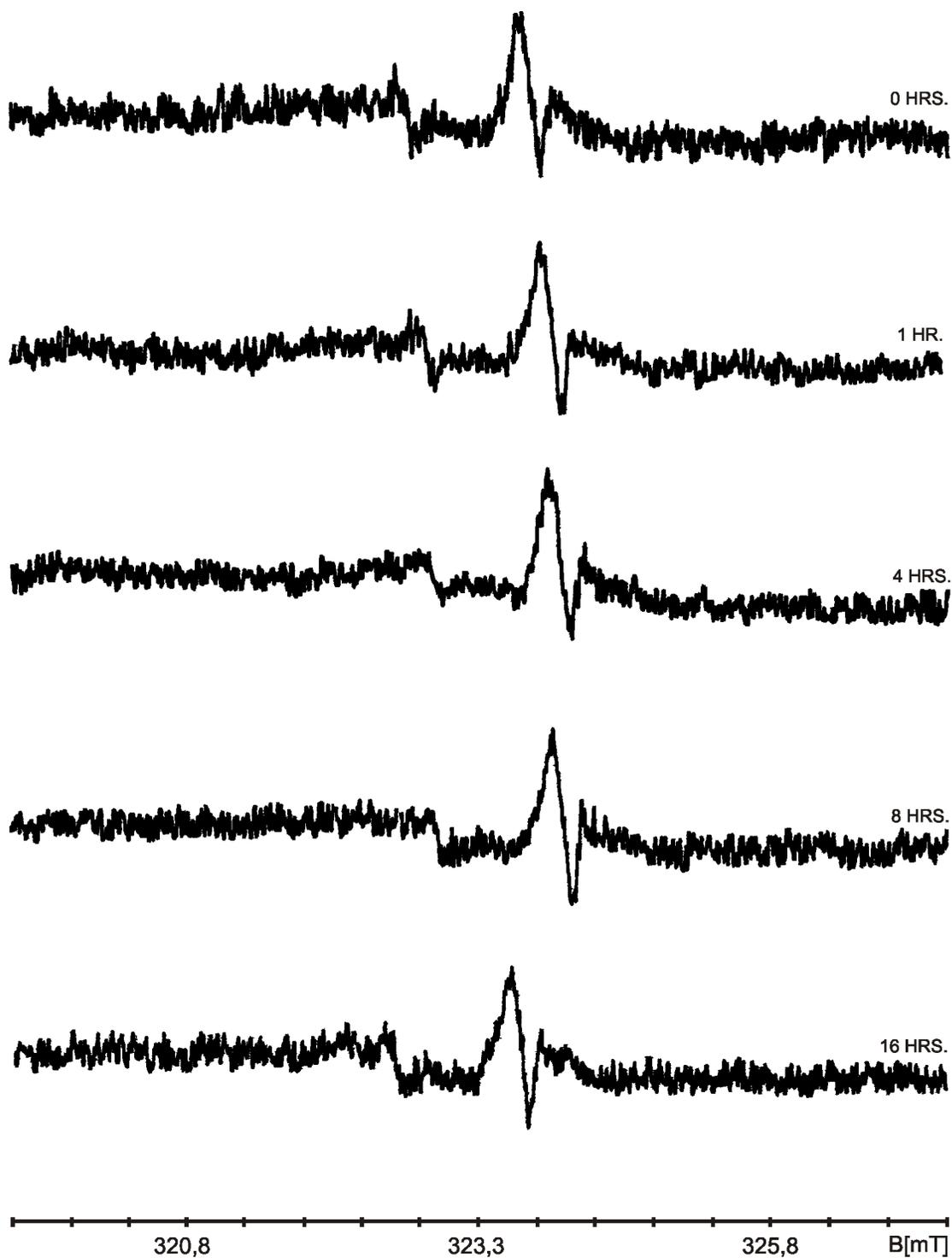


Figura C.2: Curso temporal de los espectros RPE para el HR.

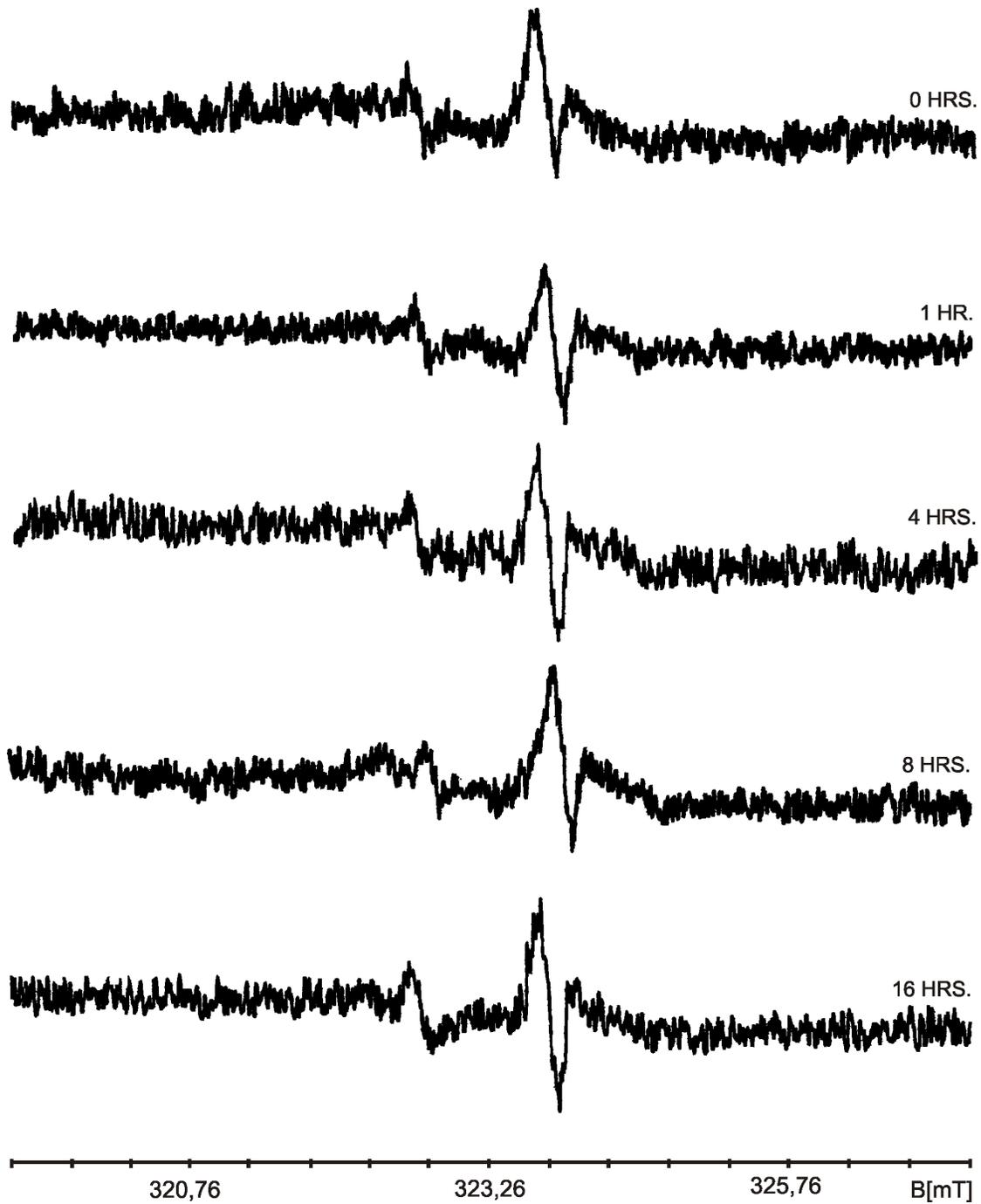


Figura C.3: Curso temporal de los espectros RPE para la ZI.

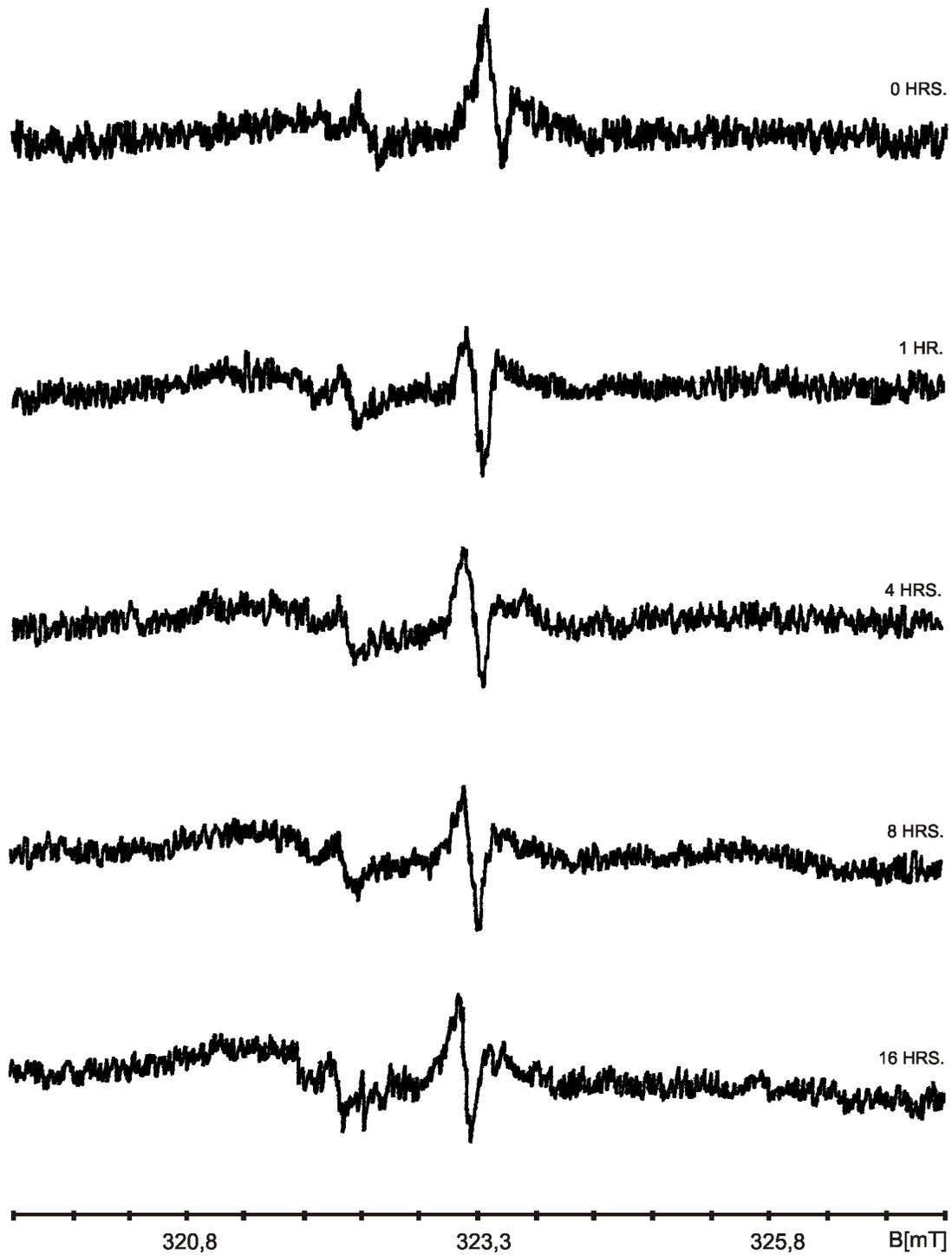


Figura C.4: Curso temporal de los espectros RPE para ventana cerrada.

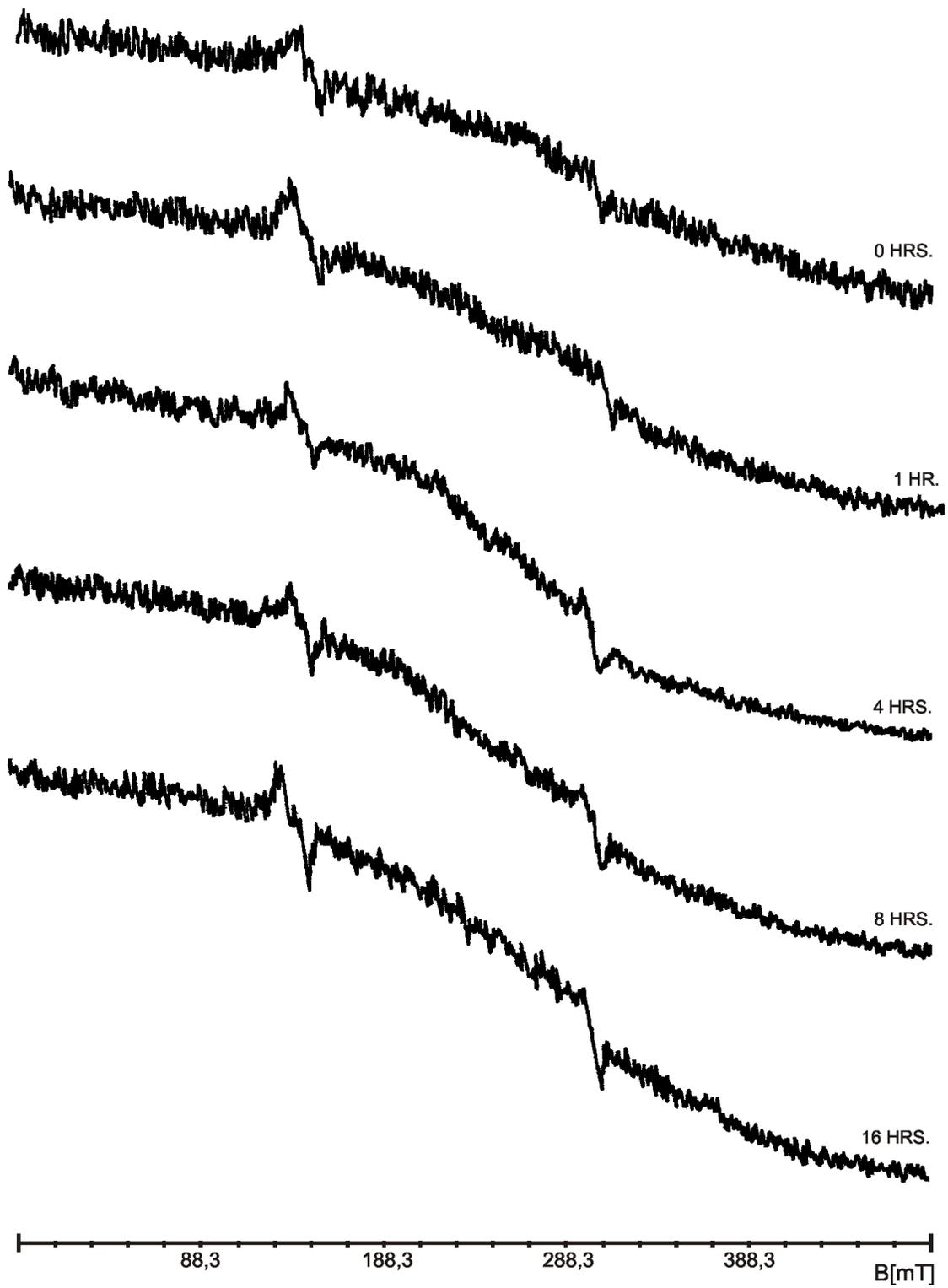


Figura C.5: Curso temporal de los espectros RPE para plasma ventana abierta.

Apéndice D

Glosario

Ácido láctico. Líquido incoloro, viscoso, que se obtiene por fermentación de azúcares.

Adosar. Poner una cosa junto a otra que le sirve de respaldo o apoyo.

Anaerobiosis. Capacidad que poseen algunos organismos para vivir sin oxígeno molecular libre.

Anoxia. Falta de oxígeno en la sangre, en las células o en los tejidos corporales.

Arterias. Vasos sanguíneos que llevan la sangre, ya sea rica o pobre en oxígeno, desde el corazón hasta los órganos corporales.

Ateroesclerosis. Placas amarillentas de grasa que se encuentran en la superficie interna de la arteria.

Capilares. Son vasos sumamente delgados en que se dividen las arterias y que penetran por todos los órganos del cuerpo, al unirse de nuevo forman las venas.

Cauterización. Curación de una herida quemando o destruyendo tejidos.

Celeridad. Prontitud, rapidez, velocidad.

Células polimorfonucleares. Se llaman también Neutrófilos. Son células pertenecientes a la serie blanca pertenecientes al sistema inmune y que se encarga de proteger nuestro cuerpo de las infecciones bacterianas fundamentalmente.

Citoquinas. Son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares, inducen la activación de receptores específicos de membrana. Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación.

Coagulación. Solidificación de los líquidos, especialmente de la sangre.

Coágulo. Porción o grumo extraído de una sustancia coagulada, en especial de la sangre.

Cortical. De la corteza o relativo a ella.

Decúbito. Posición del cuerpo tumbado horizontalmente.

Diapédesis. Propiedad de los glóbulos de traspasar los capilares, introduciéndose por los poros. Esto les permite alcanzar cualquier rincón de nuestro organismo.

Dorsal. Del dorso, revés o espalda de una cosa o persona.

Edema. Es la acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en las cavidades del organismo.

Embolia. Obstrucción de un vaso sanguíneo por un coágulo.

Encéfalo. Conjunto formado por el cerebro, el tronco cerebral y el cerebelo.

Endotelio. Es una delicada capa de revestimiento interno de todos los vasos sanguíneos formada por unas células planas perfectamente adosadas.

Esternón. Es el hueso donde se unen las costillas por delante, en el pecho. La horquilla esternal se dibuja en la base del cuello.

Fibrina. Sustancia insoluble en agua que contribuye a la coagulación de la sangre.

Fisiopatología. Es el estudio de los procesos patológicos (enfermedades), físicos y químicos que tienen lugar en los organismos vivos durante la realización de sus funciones vitales.

Hemorragia cerebral. Es el término utilizado para expresar cuando la sangre se esparce y daña el tejido cerebral adyacente.

Hendidura. Abertura o corte profundo en un cuerpo sólido que no llega a dividirlo del todo.

Hernia. Tumor producido por el desplazamiento o la salida total o parcial de una víscera u otra parte blanda fuera de su cavidad natural.

Hipocampo. Eminencia alargada situada junto a los ventrículos laterales del cerebro.

Hinchazón. Aumento del contenido de agua.

Horquilla esternal. Es una “ muesca ” (concauidad) que hay en la parte superior del esternón.

Hueso parietal. Es un hueso del cráneo, plano, par, de forma cuadrilátera, con dos caras, interna (endocraneal) y externa (exocraneal), y cuatro bordes con sus respectivos ángulos.

Incisión. Hendidura poco profunda que se hace en algunos cuerpos con un instrumento cortante.

Infusión intraperitoneal. Método usado para administrar líquidos y medicamentos directamente en la cavidad abdominal, por un tubo delgado.

Isquemia. Es la disminución o interrupción de la irrigación sanguínea de un órgano o de un tejido.

Leucocitos. Son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmune. Son células vivas que se trasladan, se salen de los capilares y se dedican a destruir los microbios y las células muertas que encuentran por el organismo.

Membrana. Tejido animal o vegetal de forma laminar y consistencia blanda y elástica.

Necrosis. Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo.

Oclusión. Acción y resultado de cerrar u obstruir algo.

Perfusión. Administración de un medicamento.

Protrombina. Proteína plasmática que participa en la coagulación de la sangre: debido a la vitamina K, la protrombina se convierte en trombina.

Sedimento. Materia que tras haber estado suspensa en un líquido se posa en el fondo del recipiente que la contiene.

Sutura. Una sutura o unos puntos son una intervención médica en la cual se junta la piel, órganos internos, tejidos vasculares y cualquier otro tejido después de haber sido severamente dañados o separados.

Tisular. De los tejidos del organismo o relativo a ellos.

Trepanar. Perforar el cráneo u otro hueso con fin curativo o diagnóstico.

Trépano. Instrumento quirúrgico para trepanar.

Trombo. Coágulo de sangre en el interior de un vaso.

Umbral. Valor a partir del cual empiezan a ser perceptibles los efectos de un agente físico.

Vascular. De los vasos de animales y plantas o relativo a ellos.

Vasoconstricción. Es la constricción o estrechamiento de un vaso sanguíneo manifestándose como una disminución de su volumen.

Vasos sanguíneos. Son conductos musculares elásticos que distribuyen y recogen la sangre de todos los rincones del cuerpo (arterias, capilares y venas).

Venas. Son vasos de paredes delgadas y poco elásticas que recogen la sangre y la devuelven al corazón.

Bibliografía

- [1] Piña Barba María Cristina, La física en la medicina, la ciencia para todos/37 del Fondo de Cultura Económica,(2002).
- [2] J. M. Rodríguez Perón, J. R. Menéndez López y Y. Trujillo López, Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. Rev Cubana Med Milit; 30(1): 36-44,(2001).
- [3] M. Kopáni, P. Celec, L. Danisövič, P. Michalka, C. Biró, Oxidative stress and electron spin resonance, Elsevier; 364, 61-66,(2005).
- [4] Hermes A. Kontos, MD, PhD, Oxygen Radicals in Cerebral Ischemia, Special Report,2712-2716,(2001).
- [5] E. García, A. L. Peraza, La melatonina, hormona antioxidante, Ciencia y Desarrollo Rev.121, 42-47,(1995).
- [6] M. Konigsberg Fainstein, Quien no oye consejo no llega a viejo, Ciencia y Desarrollo Rev. 153, 214-219,(2000).
- [7] Santamaría, Radicales Libres y el Sistema Antioxidante, Boeclinat; Análisis Bioquímicos Clínicos “Luis Pasteur”, 32-34.
- [8] R. H. Chihuailaf, P. A. Contreras y F. G. Wittwer. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. Vet. Méx., 265-283,(2002).
- [9] M. P. Sierra Vargas, A. M. Guzmán- Grenfell, I. M. Olivares-Corichi, Y. D. Torres Ramos, J. J. Hicks Gómez. Participación de las especies reactivas de oxígeno en las enfermedades pulmonares; Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 17 Número 2, 135-148,(2004).
- [10] Teófilo Rojo Aparicio, Principios Básicos de la Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica, Dpto. Química Inorgánica. Universidad del País Vasco, ERPE-4, 1-22.

-
- [11] Varios, Resonancia Magnética con fines Médicos, Aplicación en Hospital Juan Canalejo,1-62.
- [12] Anne Debroise, Misterios del cerebro un enigma por descubrir, Colección LAROUSSE El mundo contemporáneo, 88-89; 94-97,(2005).
- [13] Richard S. Snell, Neuroatomía Clínica, Editorial Medica Panamericana, 4ta Edición,554-557,(2000).
- [14] Joan Parker Frizzell, PhD, RN, Acute Stroke Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment, AACN Clinical Issues, Vol.16, Number 4, pp.421-440.(2005)
- [15] Antonio Arauz-Góngora, Juliana Coral-Casas, Adolfo Leyva-Rendón, Arch. Neurocién. (Mex., D.F.), Vol.10, No.4, (2005).
- [16] Varios, Patrones y factores de predicción de la recurrencia de accidentes isquémicos transitorios. Rev Panam Salud Pública. 2008; 23(1):70.
- [17] Purroy F, Montaner J, Molina CA, Delgado P, Ribo M, Álvarez-Sabín J. Patterns and predictors of early risk of recurrence after transient ischemic attack with respect to etiologic subtypes. Stroke. 2007; 38; 3225-9.
- [18] Castillo J, Martí-Vilalta JL, Martínez-Vila E, Matías-Guiu J.(1999). Manual de enfermedades vasculares cerebrales, Barcelona, España.
- [19] Lainez J.M., Santonja J.M. (1999). Historia natural de la enfermedad vascular cerebral. En: Castillo J, Alvarez, Sabin J, Marti Vilalta JL, Martinez E, Matias Guiu J. Manual de enfermedades vasculares cerebrales. JR Prous, 55.
- [20] Fisher M. (1999). El objetivo del tratamiento en la enfermedad cerebrovascular aguda y los enfoques terapéuticos neuroprotectores. Rev Neurol , 29:536-544.
- [21] Miranda Q. J. A. (2004). Enfermedades cerebrovasculares. Editorial Oriente. Instituto Cubano del Libro.
- [22] Castillo J, Rodríguez I. (2004). Biochemical Changes and Inflammatory Response as Markers for Brain Ischaemia: Molecular Markers of Diagnostic Utility and Prognosis in Human Clinical Practice. Cerebrovascular Diseases, 17:7-18.
- [23] Hill MD, Hachinski V. (1998). Stroke treatment: Time is brain. Lancet, 352 (Suppl): 10-14.

-
- [24] Hossmann K. A. (2006). Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. Cellular and Molecular Neurobiology, Vol. 26, Nos. 7/8, October/November.
- [25] Kwakkel G, Kollen B, Lindeman E (2004) Understanding the pattern of functional recovery after stroke: Facts and theories. Restorative Neurology and Neuroscience 22:281-299.
- [26] Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA (2004). Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 1:36-45.
- [27] Maureen McMichael, DVM, DACVECC, Ischemia-reperfusion injury: assessment and treatment, part II, Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 14(4), pp 242-252. (2004)
- [28] Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. (1999). Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin during focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 9:1038-50.
- [29] Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ (1994). Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. Stroke, 25:1847-54. 174.
- [30] Del Zoppo GJ (1994). Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 6:47-96. 153.
- [31] Hossmann, 1994.
- [32] Tomita, M. (2005). Pathophysiology of brain edema. In: Kalimo, H. (Ed.), Cerebrovascular Diseases, ISN Neuropath, Basel, Switzerland, 33-46.
- [33] Varios, Annual Health Statistics report, 21, (1999).
- [34] Garnette R., Sutherland M.D., Gary A., Roland N. A. (1996). Effect of Age in rodent models of focal and forebrain ischemia. Stroke, 27, 1663.
- [35] García JH (1984). Experimental ischemic stroke: a review. Stroke, 1:5-14.
- [36] Ohlsson AL, Johansson BB (1995). Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. Stroke, 26: 644-649.

- [37] Ginsberg MD, Belayev L, Zhao W, Back T, Dietrich WD, Busto R (1996). The pathophysiological significance of metabolism/blood flow uncoupling in acute ischemic and traumatic brain injury. Medpharm Scientific, Stuttgart, Germany. En: Pharmacology of Cerebral Ischemia. Krieglstein J (Ec.). pags. 245-58.
- [38] Belayev L, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. (1997). Transient middle cerebral artery-occlusion by intraluminal suture. I. Three dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during early ischemia and early recirculation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 1266-80.
- [39] Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB (1997). Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 28: 2060-2066.
- [40] Corbett D, Nurse S. (1998): The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol*, 54: 531-548.
- [41] Traysman R.J. (2003). Animals models of focal and global cerebral ischaemia. *J. ILAR*, 44, 85.
- [42] Dorman PJ, Counsell CE, Sandercock AG (1996). Recently developed neuroprotective therapies for acute stroke. A qualitative systematic review of clinical trials. *CNS Drugs* 5:457-74.
- [43] Isabelle Margaille, Michel Plotkine, Dominique Lerouet, Antioxidant strategies in the treatment of stroke, *Free Radical Biology and Medicine* **39**, 429-443.(2005)
- [44] P.G. Peña-Tapia, A.H. Díaz, J.L. Torres, Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna, *REV NEUROL* 2004; 39 (11): 1011-1016.
- [45] Olivia Hurtado, Javier De Cristóbal, Verónica Sánchez, Ignacio Lizasoain, Antonio Cárdenas, Martha P. Pereira, M. Isabel Colado, Juan C. Leza, Pedro Lorenzo, and María A. Moro, Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke, *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.02-1086fje. (2003)
- [46] Hajnalka ábrahám, Anikó Somogyvári-Vigh, Jerome L. Maderdrut, Sándor Vigh, Akira Arimura, Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats, *Exp Brain Res* (2002) 142:131-138.

- [47] Varios, Norma Mexicana NMX-CH-140-IMNC-2002 “Guía para la expresión de incertidumbres”.
- [48] Chavarría Castañeda Mario. Curso “Procesos de medición e incertidumbre” en el Laboratorio de Termometría de la ESFM del I.P.N, (2007).
- [49] www.caymanchem.com/
- [50] Andrei L.Kleschyov, Philip Wenzel, Thomas Munzel, Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide, *Journal of Chromatography B* **851**, 12-20.(2007)
- [51] Varios, Radicales libres y EPR, Textos complementarios para el curso de Fisicoquímica, Química Física, Atkins, 6ta, capítulo 18,1-40.
- [52] Daniel Ramírez Rosales, Resonancia Paramagnética Electrónica de Nuevos Transportadores Sintéticos de Oxígeno con Hierro, Tesis Maestro en Ciencias, ESFM-IPN.(1995)
- [53] Laura Nanneti,Ruja Taffi,Arianna Vignini,Cinzia Moroni,Francesca Raffaelli, Tiziana Bacchetti, Mauro Silvestrini, Leandro Provincialli, Laura Mazzanti, Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke, *Mol Cell Biochem* (2007) 303:19-25
- [54] J. Pineal, Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain barrier breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model,**34**:110-118.(2003)
- [55] Drago R. S. "Physical Methods in Chemistry", Ed. Saunders College Publishing, Florida (1997).
- [56] Antonio Cherubini, Carmelinda Ruggiero, M. Cristina Polidori, Patrizia Mecocci, Potential markers of oxidative stress in stroke, *Free Radical Biology and Medicine*,**39**, 841-852.(2005)
- [57] Francisco Javier Méndez Chávez, Detección directa de radicales libres por RPE en un experimento de choque séptico, Tesis Licenciado en Física y Matemáticas, ESFM-IPN.(2006)
- [58] Andreas K., David A. Geller, Michael A Sweetland, Mauricio Di Silvio, Timothy R. Billiar, Juan B. Madariaga, Richard L. Simmons and Jack R. Lancaster, Induction of nitric oxide synthesis and its reactions in cultured human and rat hepatocytes stimulated

with cytokines plus LPS, Biochemical and Biophysical research communications, Vol. 194, No.2, 826-835 (1993)

[59] G. Feher, Electron Paramagnetic Resonance with applications to selected problems in Biology, Editorial Gordon and Breach, Science Publishers, 2-4. (1970)

[60] Johana Nieves RN,CRNP, CNRN, MSN, and Debbie Capone Swearer, RN, CNA,BC, MSN, The clot that changes lives, Nursin Critical Care, Volumen 1, Number 3, (2006).