

# Antagonistas del receptor NMDA en isquemia cerebral focal.

## Modelo experimental

EDGAR NATHAL\*  
JUAN MANUEL MIQUELAJAUREGUI\*  
FERNANDO HERREMAN\*  
RAUL ALVARADO\*  
VIKTOR ROMERO\*  
JOSE HUMBERTO MATEOS GOMEZ\*\*

### Resumen

*En el daño neuronal isquémico, uno de los mecanismos finales de lesión celular es la entrada abrupta de calcio al interior de la célula mediada por canales dependientes de voltaje o por activación de receptores NMDA (N-metil D-aspartato), que origina destrucción de las membranas y el citoesqueleto.*

*Se probó la utilidad terapéutica de un bloqueador no competitivo del receptor NMDA (MK-801, 2mg/kg intraperitoneal), para reducir la extensión del daño neuronal en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en rata. El MK-801 se administró 10 minutos antes (grupo 3) y una hora después de la oclusión (grupo 4), y los resultados se compararon con un grupo de oclusión sin medicamento (grupo 2) y un grupo control (grupo 1). Se encontró que la administración de MK-801 redujo significativamente el área de infarto en relación al grupo de oclusión sin medicamento ( $p < 0.05$ ), con mayor efectividad cuando se administró de forma profiláctica (10 minutos antes de la oclusión) (grupo 3). Estos resultados sugieren que el MK-801 puede ser efectivo en la prevención de daño neurológico post-isquémico. Sin embargo, antes de recomendar su aplicación clínica, deberán definirse sus posibles efectos colaterales.*

**PALABRAS CLAVE:** INFARTO CEREBRAL; BLOQUEADORES DE CALCIO; ISQUEMIA FOCAL

### Summary

*Ischemic cerebrovascular disease is an important cause of morbidity and mortality. One common final pathway in neuronal ischemic damage is the uncontrolled influx of calcium into the cell, mediated by voltage dependent channels or activation of the NMDA (N-methyl D-aspartate) receptor. The therapeutic utility of a non-competitive NMDA blocker (MK-801, 2 mg/kg i.p.), to prevent the neuronal ischemic damage in an experimental middle cerebral artery occlusion model has been tested. The drug was administered 10 minutes before (group 3) and one hour after the arterial occlusion (group 4), and the results were compared with a group in which no medication was utilized (group 2) and a control group (sham operation, group 1). MK-801 reduced significantly the area of infarction in relation to the control group ( $p < 0.05$ ), mainly if the MK-801 was administered before the occlusion (group 3). These results suggest that MK-801 may be useful for the prevention of the neuronal ischemic damage caused by focal ischemia. However, before recommending its use in humans, all the possible collateral effects must be defined.*

**KEY WORDS:** FOCAL ISCHEMIA; CALCIUM CHANNEL BLOCKERS; CEREBRAL INFARCTION

\* Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

\*\* Académico titular. División de Neurocirugía, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877, Tlalpan, 14269, México, D. F.

## Introducción

La enfermedad vascular cerebral (EVC), después de las enfermedades cardíacas y el cáncer, ocupa el tercer lugar como causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados, y constituye una de las diez primeras causas de morbilidad en México.<sup>1</sup>

Quiénes logran sobrevivir a un ataque de apoplejía sufren secuelas, muchas de ellas incapacitantes. A pesar de que la incidencia de la EVC ha ido disminuyendo en los últimos 30 años, todavía constituye un problema importante de salud pública con un alto costo social.

Hace aproximadamente diez años, se propuso que la necrosis neuronal en la isquemia, hipoglicemia, y el "status" epiléptico, se encontraban íntimamente relacionados con la entrada de calcio al interior de neuronas que son selectivamente vulnerables debido a que poseen una alta densidad de canales de calcio dependientes de voltaje y de aminoácidos excitatorios (AAE). Se demostró que la pérdida de la homeostasis del calcio conduce a daño celular debido a una lipólisis y proteólisis incontroladas, las cuales causan daño a la membrana celular y degradación del citoesqueleto.<sup>2-4</sup> Un mecanismo importante que determina la entrada exagerada de calcio al interior celular está condicionado por la activación de canales de calcio operados por agonistas, notablemente por el L-glutamato y otros AAE relacionados. Aunque los AAE pueden también dañar a la célula a través de una entrada anormal de sodio y cloro, por su efecto osmótico concomitante, existe acuerdo en que la mayor parte del daño celular se encuentra condicionado por el calcio.<sup>5</sup>

El calcio normalmente entra a la célula a través de uno de los tres tipos de canales de calcio (designados como L, T y N), o a través de canales en los receptores a L-glutamato que también son de tres tipos, a saber, los activados por N-metil D-aspartato (NMDA), kainato (K) y AMPA (A).<sup>6</sup> Los receptores a kainato y AMPA (también conocidos como no-NMDA) son permeables principalmente a cationes monovalentes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e H<sup>+</sup>), mientras que el canal regulado por NMDA lo es al calcio. El receptor NMDA es bloqueado por algunos antagonistas competitivos, mientras que el canal asociado al receptor es bloqueado por el magnesio y otros antagonistas no-competitivos como la ketamina, fenciclidina, y compuestos como el MK-801 (dizocilpina).<sup>7,8</sup> La hipótesis excitotóxica del daño neuronal asociado al calcio se apoya en resultados que han demostrado que los antagonistas competitivos y no-competitivos del receptor NMDA son capaces de reducir el tamaño de infartos experimentales causados por isquemia focal.<sup>8,9</sup>

De acuerdo a esta hipótesis, el daño celular puede ser prevenido por: 1) Bloqueo de la activación del receptor a glutamato, 2) aumento de la actividad de neurotransmisores inhibitorios, 3) bloqueo de la entrada de calcio al interior celular, 4) inhibición de la actividad de la proteína quinasa C y 5) protección en contra del daño celular.

En este trabajo, se decidió comprobar la utilidad del MK-801 (un antagonista no competitivo del receptor NMDA), para reducir el tamaño de infartos producidos experimentalmente en un nuevo modelo de oclusión de la arteria cerebral media (ACM) en rata, en comparación con un grupo control.

## Material y métodos

Veinte ratas adultas tipo wistar con un peso entre 230-320 gr se mantuvieron a temperatura ambiente que osciló entre los 22-26°C, con 50 por ciento de humedad y bajo ciclo sueño-vigila de aproximadamente 12 hr. Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua. Todas fueron anestesiadas con hidrato de cloral a una dosis de 200 mg/kg bajo respiración espontánea. Se canalizó la arteria ventral de la cola de la rata para monitoreo continuo de la presión arterial media (PAM). Se tomaron muestras repetidas de sangre a través de esta vía para medición seriada de pH, hematocrito, y glicemia. Se ocluyó la ACM utilizando el método descrito por Zea Longa,<sup>10,11</sup> modificado por Kawamura et al.<sup>12,13</sup> En resumen, este método consiste en el aislamiento de la arteria carótida externa (ACE) izquierda a través de una incisión ventral medial en el cuello de la rata. Se identifican la arteria tiroidea superior y occipital de la ACE, se coagulan y se cortan. La única rama de la arteria carótida interna (ACI) extracranial, la arteria pterigopalatina es igualmente diseccionada y aislada. El origen de la arteria pterigopalatina es ocluido con un clip microvascular de tal manera que la sutura intraluminal de nylon empleada para ocluir la ACM no sea erróneamente introducida en este vaso. Posteriormente, la ACE fue ocluida con una doble ligadura de seda 6-0 y seccionada para formar un muñón arterial. A través de este muñón se introdujo una sutura de nylon 3-0 de 20 mm de longitud que había sido previamente redondeada en uno de sus extremos con una lija fina. Se introdujeron aproximadamente 17.5 mm de la sutura a través de la ACI extracranial hasta llegar a sentir una ligera resistencia, indicando que la punta de la sutura había llegado a la arteria cerebral anterior y que la arteria cerebral media había sido ocluida en su origen. De esta manera, el flujo sanguíneo hacia la ACM proveniente de la ACI, la arteria cerebral anterior y la arteria cerebral posterior fue bloqueado a nivel del polígono de Willis.

El MK-801 se disolvió en solución salina a una concentración final de 3 mg/ml. La dosis administrada fue de 2 mg/kg de peso, intraperitoneal. Las ratas fueron divididas en 4 grupos: grupo 1, control (operación simulada). Grupo 2, oclusión de la ACM sin empleo de neuroprotectores. Grupo 3, oclusión de la ACM con administración de MK-801 diez minutos antes de la oclusión. Grupo 4, oclusión de la ACM y administración de MK-801 una hora después de la oclusión. Todas las ratas fueron exploradas neurológicamente a las 8 y 24 hr. La severidad del déficit motor fue clasificada en 4 grados de acuerdo a Bederson et. al.<sup>14</sup>; grado 0, ningún déficit observable; grado 1, extremidad anterior en flexión; grado 2, disminución de la resistencia al desplazamiento lateral; grado 3, marcha en círculo hacia el lado parético (lateropulsión).

Veinticuatro hr después de la oclusión de la ACM, las ratas fueron nuevamente anestesiadas con la misma dosis de hidrato de cloral, se expuso el corazón mediante una toracotomía para insertar una cánula en la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo. La arteria aorta abdominal se ocluyó y se practicó una incisión en la aurícula derecha. La fijación por perfusión se llevó a cabo con formalina al 10 por ciento para inmediatamente después extraer el cerebro y depositarlo en formalina a la misma concentración para su estudio histopatológico. El cerebro se incluyó en parafina y se realizaron secciones coronales con un grosor de 5 micras para ser teñidas con hematoxilina y eosina. El área analizada se situó en un corte coronal a 6 mm del polo frontal. Las áreas de infarto fueron medidas utilizando un programa de digitalización de imágenes (Targa truevision, IBM). El área de infarto fue calculada mediante un programa de computación que utiliza integración numérica de las áreas infartadas en el corte coronal con un factor de conversión de píxeles a milímetros. El área de infarto se expresó como un porcentaje del área cerebral total del corte seleccionado y en términos absolutos en mm cuadrados.

Se calculó la media, desviación estándar y error estándar de todos los datos. Se realizó un análisis de varianza a través del método de ANOVA y la comparación intergrupala mediante la prueba "t de Student". Se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## Resultados

En todos los grupos la PAM permaneció dentro de límites normales durante el procedimiento. En las ratas en las cuales se midió pH, glicemia y hematocrito, no se registraron cambios durante la oclusión. Algunas ratas desarrollaron una hipercapnia leve durante la anestesia.

## Exploración neurológica

La exploración neurológica en el grupo 1 fue normal en todas las ratas. En el grupo 2, a las 8 hr fue grado 2 en una rata y grado 3 en cuatro. A las 24 hr, dos ratas permanecieron en grado 3 y tres en grado 2. En los grupos 3 y 4 el total de animales permanecieron en grado 3 a las 8 y 24 hr, e inclusive algunas de ellas presentaron un aspecto moribundo.

## Tamaño del infarto

El valor porcentual del tamaño del infarto para todos los grupos se expresa en la Figura 1. Existió un patrón consistente de daño isquémico, y ejemplos típicos de infartos en los grupos 2-4 se muestran en la Figura 2. En el grupo 1 (operación simulada), no se presentaron en ninguna de las ratas áreas de infarto. En el grupo 2, la media y DS del área total de infarto fue de  $46,1 \pm 7,3 \text{ mm}^2$ ; en el grupo 3 de  $5,3 \pm 3,3 \text{ mm}^2$ ; y en el grupo 4 de  $14,4 \pm 4,9 \text{ mm}^2$ . La reducción del área de infarto fue mayor en el grupo 3 y en el grupo 4 en comparación al grupo 2 ( $p < 0,05$ ), sin embargo, también existió una diferencia significativa en el efecto terapéutico del MK-801 cuando se administró antes o una hora después de la oclusión ( $p < 0,05$ ).

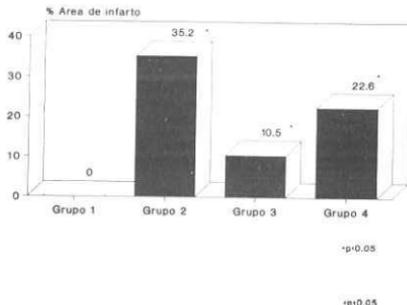


Fig. 1. Oclusión de la arteria cerebral media. Efecto terapéutico del MK-801.

## Discusión

La EVC isquémica es una causa importante de mortalidad e incapacidad funcional en los países industrializados y ocupa una de las diez primeras causas de mortalidad en México, sin embargo, hasta el momento los resultados terapéuticos han sido decepcionantes. Los mayores pro-

gresos han sido logrados en la prevención de los eventos vasculares isquémicos, principalmente a través del control de la hipertensión arterial y de la isquemia cerebral producida por causas cardíacas.<sup>1</sup> Aun cuando se reconoce que la prevención es el factor más importante para disminuir la incidencia de este tipo de padecimientos, se llevan a cabo grandes esfuerzos para reducir las consecuencias de un evento isquémico una vez que este se ha instalado.

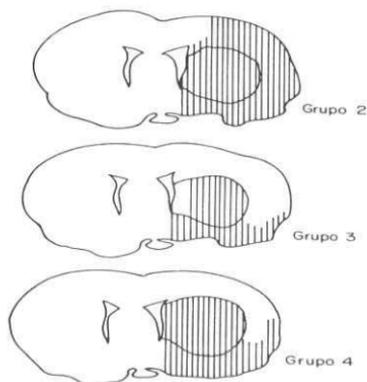


Fig. 2. Ejemplos gráficos de la extensión del área de infarto en los diferentes grupos de estudio (ver texto para descripción de los grupos).

La supresión de la aporte circulatorio en un tronco vascular determinado produce una lesión con dimensiones variables en un territorio que se encuentra definido por la topografía vascular. Esta lesión sufre un proceso evolutivo en horas, días y semanas que permiten su caracterización histopatológica. Por otra parte, las evidencias experimentales sugieren que la muerte neuronal es causada por una activación descontrolada de receptores al L-glutamato. Este AAE activa al receptor NMDA que a su vez, produce un daño excitotóxico de naturaleza post-sináptica que se relaciona con el calcio y el sodio. El calcio citosólico activa varias enzimas proteolíticas que terminan con la destrucción celular.<sup>2,4,15</sup> Este mecanismo citotóxico ha sido propuesto también para otro tipo de enfermedades no isquémicas tales como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, entre otras.<sup>2</sup> En base a lo anterior, recientemente se ha incrementado el interés en la posible aplicación terapéutica

de antagonistas de los AEE. En particular, evidencia derivada de estudios animales han indicado que antagonistas del receptor NMDA poseen propiedades anticonvulsivantes y ansiolíticas, con un efecto preventivo sobre la degeneración neuronal causada por la isquemia, anoxia, hipoglicemia y neurotoxinas endógenas.<sup>6-9</sup> Como agentes terapéuticos, los antagonistas no competitivos NMDA son compuestos lipofílicos que rápidamente penetran al sistema nervioso central, a diferencia de los antagonistas competitivos disponibles. De estos antagonistas no competitivos, el más potente de ellos hasta ahora conocido es el MK-801 (dizocilpina) (Figura 3), y su utilidad ha sido demostrada en algunos modelos de isquemia focal.<sup>7,16</sup>

Un aspecto importante de los estudios sobre daño

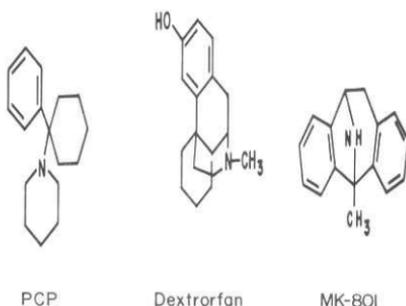


Fig. 3. Estructura química de algunos antagonistas no-competitivos del receptor NMDA.

isquémica ha sido determinar si es posible definir el efecto terapéutico de las drogas empleadas, aun cuando se apliquen algunas horas después de ocurrido un episodio isquémico, ya que esta situación es muy común en la práctica clínica debido al tiempo que transcurre entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento. En base a lo anterior, decidimos probar la utilidad del MK-801 cuando se administra antes y una hora después de la oclusión experimental de la ACM en rata.

### Resultados terapéuticos

En el modelo empleado en este estudio, la oclusión intraluminal de la ACM produjo un infarto masivo del tejido cerebral en el lado ocluido, que en promedio para el

grupo 2 (grupo sin tratamiento) fue de 35.2 por ciento de la superficie total del corte. La administración del MK-801 (2 mg/kg i.p.) 10 minutos antes de la oclusión fue capaz de producir una reducción importante en el área total de infarto en un 65 por ciento en comparación al grupo sin tratamiento ( $p < 0.05$ ). Este grado de neuroprotección había sido previamente publicado en casos de administración pre-oclusión.<sup>9</sup> Por otra parte, la administración de este fármaco una hora después de la oclusión produjo una disminución del infarto en un 35 por ciento en comparación al grupo sin tratamiento ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que el uso del MK-801 (2 mg/kg i.p.) puede ser de valor terapéutico en isquemia focal, principalmente dentro de la primera hora de instalada la isquemia. Esta situación, aunque difícil en la práctica clínica, pudiera ser de utilidad en estados de isquemia aguda que ocurren en medios intrahospitalarios (procedimientos endovasculares, oclusión vascular intraoperatoria, oclusiones espontáneas, etc.). El mecanismo de acción más probable del MK-801 es el rescate de las zonas de "penumbra isquémica" en la región del infarto para proteger en contra del daño causado por exceso de activación de los receptores para AAE (Figura 4)<sup>16</sup>. Queda por determinar en estudios posteriores la totalidad de la "ventana terapéutica" de este fármaco para su posible utilidad en etapas más tardías de la isquemia, sin embargo, es una realidad que hasta el momento no existe ningún fármaco reconocido que brinde una neuroprotección si se aplica después de 5 hr de haberse instalado un evento isquémico cerebral focal.<sup>16,17</sup> En estos casos habría que considerar el valor terapéutico de la perfusión trasvenosa retrógrada para poder hacer llegar al fármaco a las áreas isquémicas.

## Evaluación neurológica

La evaluación neurológica de las ratas nos permitió evaluar indirectamente el impacto clínico del infarto y en cierta manera, los efectos colaterales del MK-801. En este estudio, encontramos que en el grupo sin medicamento la valoración realizada 8 hr después de la oclusión, mostró en la mayoría de los casos un grado 3 con tendencia a evolucionar a un grado 2 dentro de las primeras 24 hr, sin embargo, en los grupos 3 y 4 (tratados con MK-801), la exploración neurológica mostró un grado 3 en todas las ratas sin tendencia a la mejoría neurológica, es decir que a pesar de que hubo una reducción objetiva de las áreas de infarto, este efecto terapéutico no se reflejó en mejores condiciones neurológicas. La causa de este fenómeno hasta el momento no tiene una explicación satisfactoria, y no había sido reportado anteriormente. Una causa probable podría ser la interacción del MK-801 con el anestésico empleado (hidrato de cloral), sin embargo la comprobación de tal interacción requiere de estudios experimentales adicionales.

En resumen, los resultados obtenidos en este modelo experimental con el empleo del MK-801 apoyan la hipótesis de que los receptores NMDA juegan un papel importante en la degeneración neuronal inducida por isquemia. La habilidad de este antagonista cuando se administra por vía periférica para prevenir el daño neuronal, aún cuando se realice después de instalado un episodio isquémico, sugiere el uso potencial de este compuesto en el tratamiento de la EVC isquémica humana.

## Referencias

1. Barinagarrementeria F. Enfermedad Vasculare Cerebral. México: Ediciones Instituto Syntex, 1991
2. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 1988;11:465
3. Cotman CW, Iversen L. Excitatory amino acids in the brainfocus on NMDA receptors. *TINS* 1987;10:263
4. Kennedy MB. Regulation of neuronal function by calcium. *TINS* 1987;12:417
5. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *TINS* 1987;10:299
6. Herrling PL. Clinical implications of NMDA receptors. In: Watkins JC, Collingridge GL (eds). *The NMDA Receptor*. University Press, 197:177
7. Kemp JA, Foster AC, Wong EHF. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *TINS* 1987;10:274
8. Meldrum BS, Chapman AG, Patel S, Swan J. Competitive

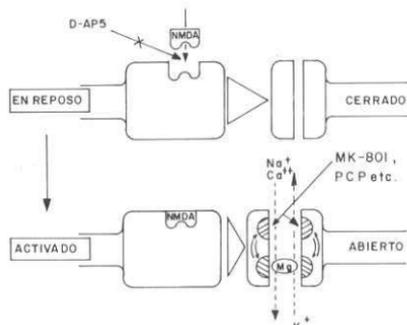


Fig. 4. Receptor NMDA y sus probables sitios de bloqueo por antagonistas competitivos (D-AP5) y no-competitivos (MK-801, PCP).

- NMDA antagonist as drugs. In: Watkins JC, Collingridge GL (eds.) *The NMDA Receptor*. University Press, 1989;207
9. Iversen LL, Woodruff GN, Kemp JA, Foster AC, McKernan R, Gill R, Wong EHF. Non-competitive NMDA antagonists as drugs. In: Watkins JC, Collingridge GL (eds.) *The NMDA Receptor*. University Press, 1989;217
  10. Zea Longa E, Wenstein PR, Carlson S, Cummings R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84
  11. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989;20:1037
  12. Kawamura S, Shirasawa M, Fukasawa H, Yasui N. Attenuated neuropathology by nivaldipine after middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke* 1991;22:51
  13. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H. Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation on acute focal cerebral ischemia in rats. *Surg Neurol* 1989;31:203
  14. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1989;17:472
  15. Miller R. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987, 235:46
  16. Foster AC, Gill R, Kemp JA, Woodruff GN. Systemic administration of MK-801 prevents NMDA-induced neuronal degeneration rat brain *Neurosciencia Letters* 1987;76:307
  17. Woodruff GN, Foster AC, Gil R, Kemp JA, Wong EHF, Inverson LL. The interaction between MK-801 and receptors for NMDA: functional consequences. *Neuropharmacol* 1987;26:903