



Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
UAM

**Efecto neuroprotector de la galantamina y  
de su combinación con memantina, en un  
modelo de isquemia cerebral global  
transitoria en el jerbo**

**TESIS DOCTORAL**

**SILVIA LORRIO GONZÁLEZ**

Directores:

Manuela García López

Antonio García García

José M. Roda Frade

Madrid, mayo 2007

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

## I. JUSTIFICACIÓN

### JUSTIFICACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. LA LESIÓN ISQUÉMICA CEREBRAL

- 1.1 Acidosis láctica y disminución del ATP
- 1.2 Aumento de la concentración de calcio intracelular
- 1.3 Liberación de neurotransmisores
- 1.4 Formación de radicales libres
- 1.5 Muerte neuronal

### 2. MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL

- 2.1 Isquemia cerebral focal
- 2.2 Isquemia cerebral global

### 3. FÁRMACOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO

- 3.1 Galantamina
- 3.2 Memantina

## III. OBJETIVOS

### OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. FÁRMACOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO

### 2. GRUPOS DE TRATAMIENTO Y PROTOCOLOS DE ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS

- 2.1 Protocolo de pre-tratamiento
- 2.2 Protocolo de tratamiento 3 h post-isquemia
- 2.3 Protocolo de tratamiento 6 h post-isquemia

- 3. INDUCCIÓN DE LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITORIA**
- 4. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA**
  - 4.1 Tinción con hematoxilina-eosina
  - 4.2 Tinción de TUNEL
  - 4.3 Inmunohistoquímica y análisis de procaspasa-3
  - 4.4 Inmunohistoquímica y análisis de caspasa-3 activa
  - 4.5 Inmunohistoquímica y análisis de SOD-1
  - 4.6 Inmunohistoquímica y análisis de SOD-2
- 5. WESTERN BLOT DE CASPASA-3, SOD-1 Y SOD-2 EN EXTRACTOS DE HIPOCAMPO**
- 6. TEST DE LOCALIZACIÓN DE OBJETOS**
- 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

## **V. RESULTADOS**

- 1. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS**
- 2. EXISTENCIA Y CALIBRE DE LAS ARTERIAS COMUNICANTES POSTERIORES**
- 3. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL PRE-TRATAMIENTO CON GALANTAMINA Y SU COMBINACIÓN CON MEMANTINA FRENTE A LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL**
- 4. POSIBLES MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR**
  - 4.1 Los tratamientos disminuyeron la fragmentación del ADN en las neuronas piramidales de CA1. Implicación de la activación del receptor nicotínico.
  - 4.2 Los tratamientos disminuyeron la expresión de caspasa-3 en el hipocampo independientemente de la activación del receptor nicotínico.
  - 4.3 Los tratamientos aumentaron la expresión de SOD-1 en el hipocampo. Implicación de la activación del receptor nicotínico.
  - 4.4 Los tratamientos disminuyeron la expresión de SOD-2 en el hipocampo. Implicación de la activación del receptor nicotínico.
- 5. EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE GALANTAMINA SE CONSERVÓ CUANDO SE ADMINISTRÓ DESPUÉS DE LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL**

6. EL TRATAMIENTO CON GALANTAMINA RECUPERÓ LA MEMORIA ESPACIAL: TEST DE LOCALIZACIÓN DE OBJETOS

## **VI. DISCUSIÓN**

1. ANÁLISIS DEL MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO
2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS
3. EFECTO NEUROPROTECTOR DE GALANTAMINA, MEMANTINA Y SU COMBINACIÓN TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL CON REPERFUSIÓN EN EL JERBO
4. EFECTO NEUROPROTECTOR DE GALANTAMINA TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL CON REPERFUSIÓN EN EL JERBO, ADMINISTRADA POST-ISQUEMIA
5. MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR
  - 5.1 Disminución de la fragmentación del ADN y de la caspasa-3.
  - 5.2 Normalización de la expresión de las enzimas SOD-1 y SOD-2.
5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GALANTAMINA Y MEMANTINA SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL CON REPERFUSIÓN EN EL JERBO

## **VII. CONCLUSIONES**

CONCLUSIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

## **IX. ANEXO**

ANEXO

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AMPA:** Ácido 2-amino-3-(4-butil-3-hidroxiisoxazol-5-il) propiónico

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**AP-1:** Proteína activadora-1

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**BCA:** Ácido bicinconínico

**Bcl-2:** Linfoma/leucemia de células B 2

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**CA1:** Cornu ammonis 1

**Caspasa:** Cisteín-aspartato proteasa

**CREB:** Proteína de unión a CRE  
(elemento de respuesta a AMPc)

**DAB:** Diaminobenzidina

**dNTP:** Deoxinucleótido trifosfato

**DTT:** ditioneitol

**ECL:** Quimioluminiscencia  
intensificada

**EDTA:** Ácido etilendiaminetetraacético

**FADH<sub>2</sub>:** Dinucleótido de flavina y  
adenina, forma reducida

**GABA:** Ácido gamma-aminobutírico

**GTP:** Trifosfato de guanosina

**GTS-21:** (2,4)-dimetoxibenzilideno  
anabaseín dihidrocloruro

**Halotano:** 2-bromo-2-cloro-1,1,1-  
trifluoretano

**H&E:** Hematoxilina-eosina

**i.p.:** Intraperitoneal

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de  
monocitos-1

**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y  
adenina, forma reducida

**NF-κB:** Factor nuclear-κB

**NMDA:** *N*-metil-*D*-aspartato

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**PMSF:** Fenilmetanosulfonilfluoruro

**PVC:** Cloruro de polivinilo

**s.c.:** Subcutáneo

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SOD:** Superóxido dismutasa

**TBS:** Tampón Tris salino

**TdT:** Deoxirribonucleotidil transferasa  
terminal

**TNF-α:** Factor de necrosis tumoral-α

**TUNEL:** marcaje mediado por la  
desoxinucleotidil transferasa  
terminal de los extremos 3'OH con  
dUTP conjugado con biotina

# **I. JUSTIFICACIÓN**

---

## **JUSTIFICACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL**

Esta tesis doctoral se enmarca en una de las líneas principales del Instituto “Teófilo Hernando” para la I + D de Fármacos (ITH), a saber, el estudio de los mecanismos de muerte neuronal y la búsqueda de fármacos neuroprotectores para prevenir o retrasar dicha muerte. Más concretamente, nuestro estudio versa sobre la posible neuroprotección tras un accidente isquémico cerebral. La enfermedad cerebrovascular es una alteración en el funcionamiento del cerebro debida a la disminución o interrupción del aporte sanguíneo al mismo por oclusión o hemorragia. Es la tercera causa de muerte por enfermedad en el mundo occidental después del cáncer y las enfermedades cardíacas. En España es la primera causa de mortalidad en mujeres y la segunda en hombres, y la primera causa de discapacidad. Las tasas de incidencia de enfermedad cerebrovascular por 100.000 habitantes se estiman en 364 en hombres y 169 en mujeres; si la incidencia se midiera en población mayor de 69 años las tasas se elevarían a 2.371 en hombres y 1.493 en mujeres (Medrano Albero *et al.*, 2006). La enfermedad cerebrovascular es, además, una causa común de demencia y declive cognitivo en la ancianidad y contribuye a la pérdida de las funciones cognitivas en la enfermedad de Alzheimer. El alto coste social y económico de la enfermedad cerebrovascular y sus secuelas impulsa la investigación dirigida a esclarecer los mecanismos fisiopatológicos responsables de la lesión del tejido cerebral sometido a isquemia, y a encontrar estrategias terapéuticas para paliar las consecuencias clínicas de la isquemia cerebral.

El estudio de los cambios vasculares, celulares y bioquímicos que tienen lugar en la isquemia cerebral ha permitido desarrollar nuevas estrategias terapéuticas como la neuroprotección, que busca reducir la lesión causada por la isquemia del tejido cerebral, especialmente vulnerable a este insulto. En los últimos 30 años ha aumentado el conocimiento de la secuencia de acontecimientos bioquímicos que acontecen inmediatamente después de un insulto isquémico. Cada paso de esta secuencia es teóricamente susceptible de ser modificado mediante intervención terapéutica para evitar en último término la muerte neuronal. Por lo tanto, una estrategia lógica a seguir consiste en combinar fármacos que actúen en distintos pasos de la cascada isquémica con la esperanza de lograr una mayor eficacia. Esta idea nos ha llevado a realizar la investigación que se presenta en la siguiente tesis doctoral, en la que evaluamos el

potencial efecto neuroprotector de la galantamina y la memantina, por sí mismas o en combinación, frente a la isquemia cerebral en un modelo experimental animal.



## **II. INTRODUCCIÓN**

---

## 1. LA LESIÓN ISQUÉMICA CEREBRAL

La isquemia cerebral es el resultado de la reducción del flujo sanguíneo del cerebro por debajo de un nivel crítico provocando la falta del oxígeno y la glucosa indispensables para el metabolismo cerebral, lo que compromete la función cerebral y provoca la muerte del tejido cerebral o infarto. La situación de isquemia cerebral puede finalizar espontáneamente, o mediante intervención terapéutica, con el restablecimiento del flujo sanguíneo, esto es, con la reperfusión. Sin embargo, la reperfusión en sí también aumenta la lesión isquémica. Por eso es menos recomendable cuando se han sobrepasado las tres o seis primeras horas, tiempo durante el cual la reperfusión es capaz de reducir la muerte neuronal.

Inmediatamente después de una isquemia cerebral, se suceden una serie de reacciones bioquímicas cuya secuencia se denomina cascada isquémica, que desemboca en la muerte de las neuronas. Entre estos acontecimientos están: la inhibición de la síntesis de proteínas, la acidosis láctica, la reducción de las reservas energéticas intracelulares, la despolarización de la membrana citoplasmática, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, el aumento en la producción de radicales libres y la liberación de neurotransmisores excitadores con la consiguiente activación de receptores y la estimulación neuronal exagerada. Estos mecanismos conducen no sólo a la lesión neuronal, sino también glial y endotelial, lesiones que repercuten a su vez en el aumento de la muerte neuronal en un ciclo que provoca que la lesión isquémica siga creciendo horas después de la isquemia (**figura 1**).

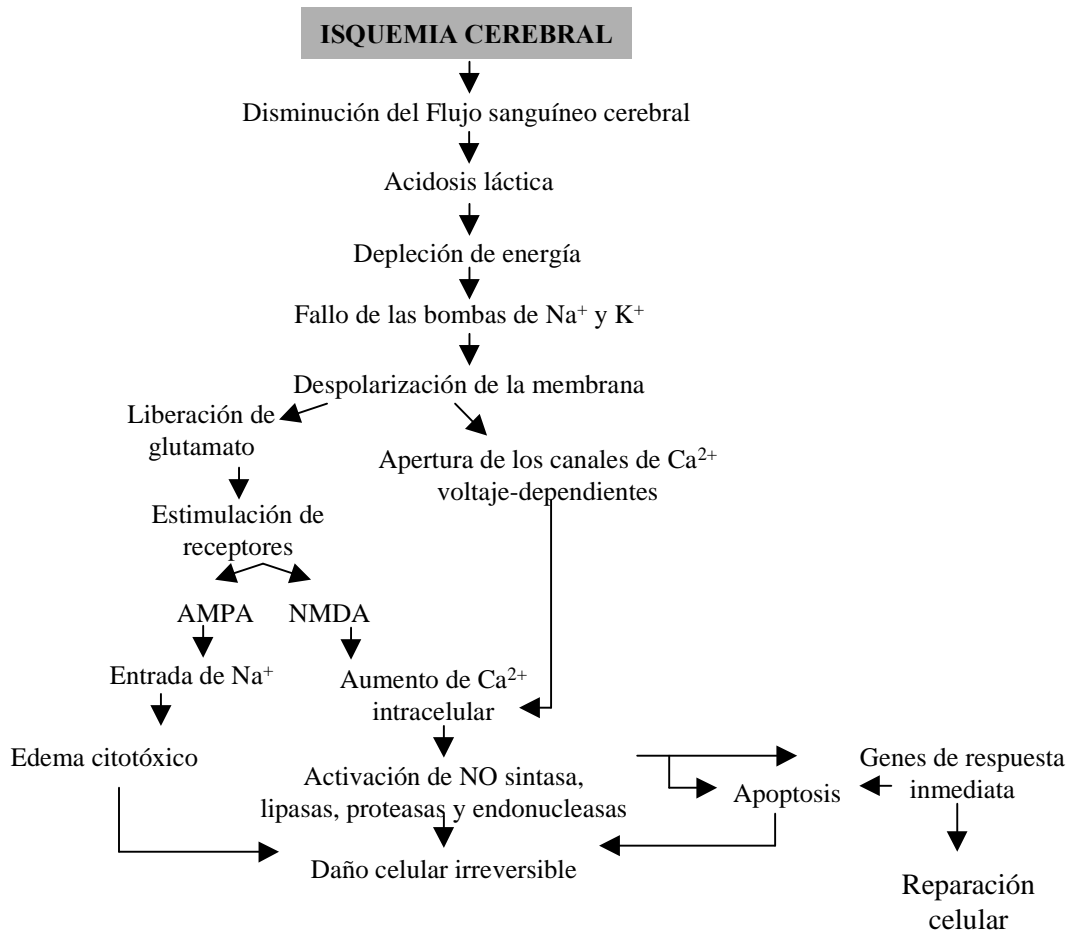


Figura 1: Esquema que representa la cascada isquémica

### **1.1 Acidosis láctica y disminución del ATP**

La falta de oxígeno debida a la isquemia produce alteraciones en el metabolismo de la glucosa. La glucosa se transforma en piruvato por la glucolisis, generándose energía en forma de ATP. En condiciones aerobias el siguiente paso es la oxidación en el ciclo de Krebs hasta dióxido de carbono y agua, produciéndose energía en forma de GTP y poder reductor en forma de NADH y FADH<sub>2</sub> que, a su vez, se utiliza en la cadena respiratoria transportadora de electrones en la mitocondria para producir más energía en forma de ATP. Sin embargo, en condiciones de anaerobiosis, el piruvato se reduce por la enzima lactato deshidrogenasa a ácido láctico para poder regenerar el poder oxidante en forma de NAD<sup>+</sup> necesario para que la glucolisis pueda producirse continuamente y obtener ATP. Así, en anaerobiosis la energía que se obtiene de la glucosa es mucho menor, sólo la resultante de la glucolisis (2 moléculas de ATP por cada una de glucosa), mientras que, en condiciones aerobias, se podrían obtener hasta 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

La insuficiencia energética impide que funcionen las ATPasas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> por lo que se pierde el equilibrio iónico necesario para la viabilidad celular: el K<sup>+</sup> sale de las neuronas y entra Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> y agua. La entrada de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y agua se relaciona con el edema celular; el acúmulo extracelular de K<sup>+</sup> se relaciona con el edema citotóxico de los astrocitos; y la entrada de Ca<sup>2+</sup> pone en marcha mecanismos de muerte celular.

El ácido láctico aumenta rápidamente, desplazando al Ca<sup>2+</sup> en su unión a proteínas tamponadoras y disminuyendo el pH, lo que provoca la desnaturalización de proteínas y la alteración de funciones enzimáticas y de recaptación de neurotransmisores (Castillo *et al.*, 1995).

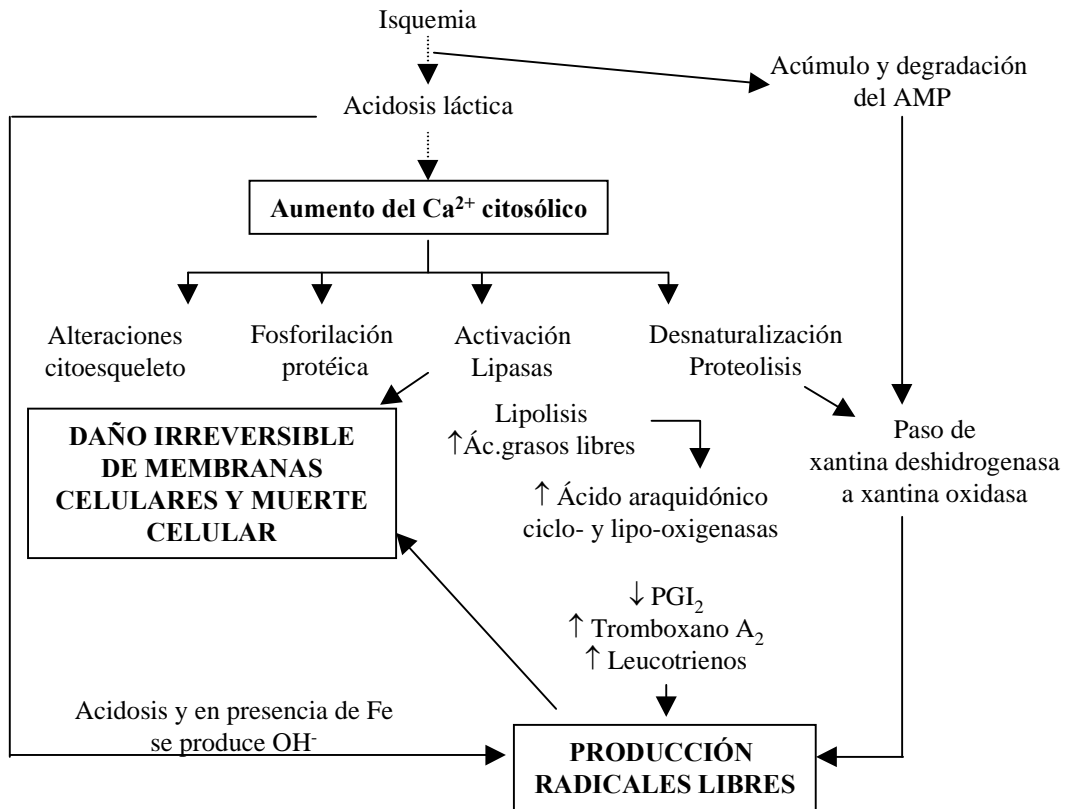
### **1.2 Aumento de la concentración de calcio intracelular**

La entrada de Na<sup>+</sup> al interior de las neuronas por el fracaso en el funcionamiento de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> produce una despolarización de la membrana que activa, entre otros, los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje y desbloquea algunos canales dependientes de ligando, permitiendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma. La concentración

de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma también aumenta por la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares (retículo endoplásmico y mitocondria).

El aumento excesivo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma origina la activación de la transcripción de genes de respuesta inmediata, que codifican para factores de transcripción que regulan a su vez la transcripción de genes de proteínas de estrés celular, factores de crecimiento neuronal,  $\text{TNF-}\alpha$ , Bcl-2, y en general proteínas que promueven supervivencia o muerte celular (Lindsay *et al.*, 1994). El aumento excesivo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma también activa proteasas, lipasas, endonucleasas, kinasas, fosfatasas y óxido nítrico sintasas, que inducen la degradación de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, despolimerización de los microtúbulos del citoesqueleto y formación de radicales libres, causando una lesión celular irreversible y contribuyendo en gran medida a la muerte neuronal (**figura 2**).

Además las mitocondrias captan el  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol gracias a su potencial de membrana (el interior es más electronegativo que el citoplasma); en condiciones de aumento excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se sobrecargan, despolarizándose, por lo que se inhibe la producción de ATP (Bernardi *et al.*, 1994), aumenta la formación de radicales libres (Coyle & Puttfarcken, 1993) y se inicia así la cascada apoptótica de muerte celular.



**Figura 2:** El aumento de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma y la producción de radicales libres provocan la muerte de las células después de una isquemia.

### **1.3 Liberación de neurotransmisores**

La despolarización prolongada de la membrana provoca la liberación descontrolada de neurotransmisores, causando una sobrecarga de estímulos en las neuronas que aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma y las conduce a la muerte celular. La noradrenalina y la serotonina producen además vasoconstricción cerebral; la glicina es un co-activador del receptor de NMDA para el glutamato, por lo que su liberación durante la isquemia contribuye a la lesión neuronal; el GABA es un neurotransmisor inhibitorio, pero la muerte de las neuronas GABAérgicas impide que funcionen los circuitos de inhibitorios.

El glutamato es el neurotransmisor excitador que juega el papel más importante en la muerte neuronal después de una isquemia. De hecho, la muerte debida al glutamato se denomina muerte neuronal excitotóxica. En condiciones normales, el glutamato liberado se recapta rápidamente por los transportadores de glía y neuronas, pero durante la isquemia, la disminución de ATP inhibe su actividad por lo que la concentración de glutamato en la hendidura sináptica puede aumentar hasta 30 veces con 10 min de isquemia (Choi & Rothman, 1990). El glutamato liberado estimula receptores ionotrópicos (AMPA/kainato y NMDA) y metabotrópicos acoplados a proteínas G. La activación de los receptores AMPA/kainato permite la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior celular ocasionando edema celular y aumentando la despolarización, lo que abre canales dependientes de voltaje como los de  $\text{Ca}^{2+}$  y desplaza al  $\text{Mg}^{2+}$  de los receptores NMDA, permitiendo su activación. Por otro lado, el glutamato activa los receptores NMDA, altamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , causando un aumento masivo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma que desencadena la muerte neuronal.

### **1.4 Formación de radicales libres**

Los radicales libres son moléculas con uno o más electrones desapareados, por lo que son especies químicas altamente reactivas. En condiciones normales se generan como consecuencia del metabolismo celular y se procesan gracias a sistemas de control presentes en las células; pero durante la isquemia y sobre todo en la reperfusión, se genera un exceso de radicales libres y especies reactivas debido a las reacciones de oxidación, que agotan los mecanismos celulares responsables de su eliminación y son

incapaces de procesarlas. Entre las especies reactivas responsables del estrés oxidativo en las neuronas están el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo (OH $\cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el óxido nítrico (NO) y el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Los principales mecanismos de defensa celular ante las especies reactivas son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa. Pequeñas moléculas antioxidantes como el glutatión, el ácido ascórbico (vitamina C) y el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) también detoxifican radicales libres.

Los radicales libres pueden realizar ataques electrofílicos sobre otras moléculas, provocando rupturas en el ADN, en proteínas y en lípidos, causando su peroxidación y, en general, dañando las estructuras celulares que encuentran a su paso. Producen poros en las membranas celulares, destruyendo orgánulos y aumentando la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana citoplasmática.

En condiciones fisiológicas, las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria mitocondrial producen constantemente especies reactivas de oxígeno como el  $O_2^{\cdot-}$ . La SOD procesa el  $O_2^{\cdot-}$  produciendo  $H_2O_2$ , que es a su vez procesado por la catalasa o por la glutatión peroxidasa. La presencia de oxígeno en la reperfusión, después de una isquemia, aumenta la génesis de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. Los  $O_2^{\cdot-}$  actúan en el interior de la célula; sin embargo el  $H_2O_2$  es capaz de difundir a otras neuronas próximas y dañarlas también (Siesjo, 1994).

El aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma durante la isquemia activa la fosfolipasa  $A_2$ , que degrada triglicéridos produciendo ácidos grasos. Estos ácidos grasos libres, acumulados durante la isquemia, se metabolizan durante la reperfusión, oxidándose y generando especies reactivas de oxígeno. Así, el ácido araquidónico se oxida por la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa dando lugar a prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos, que participan en la lesión inflamatoria. La oxidación del ácido araquidónico favorece la producción de  $O_2^{\cdot-}$ , que estimula nuevamente la fosfolipasa  $A_2$ , retroalimentando la producción de radicales libres.

La oxidación de la hipoxantina para producir xantina, y la de la xantina para producir ácido úrico en la degradación de los nucleótidos de purina, es una reacción



catalizada normalmente por la xantina deshidrogenasa. Sin embargo, durante la isquemia, el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico activa proteasas que hidrolizan la xantina deshidrogenasa dando lugar a la xantina oxidasa, que genera  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los radicales  $\text{OH}^\cdot$  se forman mediante la reacción de Fenton, en la que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$  dando lugar a  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{OH}^-$  y  $\text{OH}^\cdot$ .

El óxido nítrico (NO) es un mensajero químico cuya síntesis cataliza la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina. Se conocen tres isoformas de la enzima NOS: la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS), que son constitutivas y se regulan por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, y la inducible (iNOS), cuya transcripción se activa con la respuesta inflamatoria. El NO ejerce acción vasodilatadora, regula la neurotransmisión y la plasticidad sináptica e interviene en procesos de conducta. En isquemia cerebral se origina una elevada producción de NO, cuyo papel es controvertido ya que se relaciona tanto con neuroprotección como con neurodegeneración. Se une a la citocromo c oxidasa, que constituye el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, compitiendo con el oxígeno e inhibiendo la respiración. El NO, además, puede dar lugar a derivados reactivos como  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , S-nitrosotioles y reacciona con el  $\text{O}_2^-$  dando lugar al peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un potente oxidante.

## **1.5 Muerte neuronal**

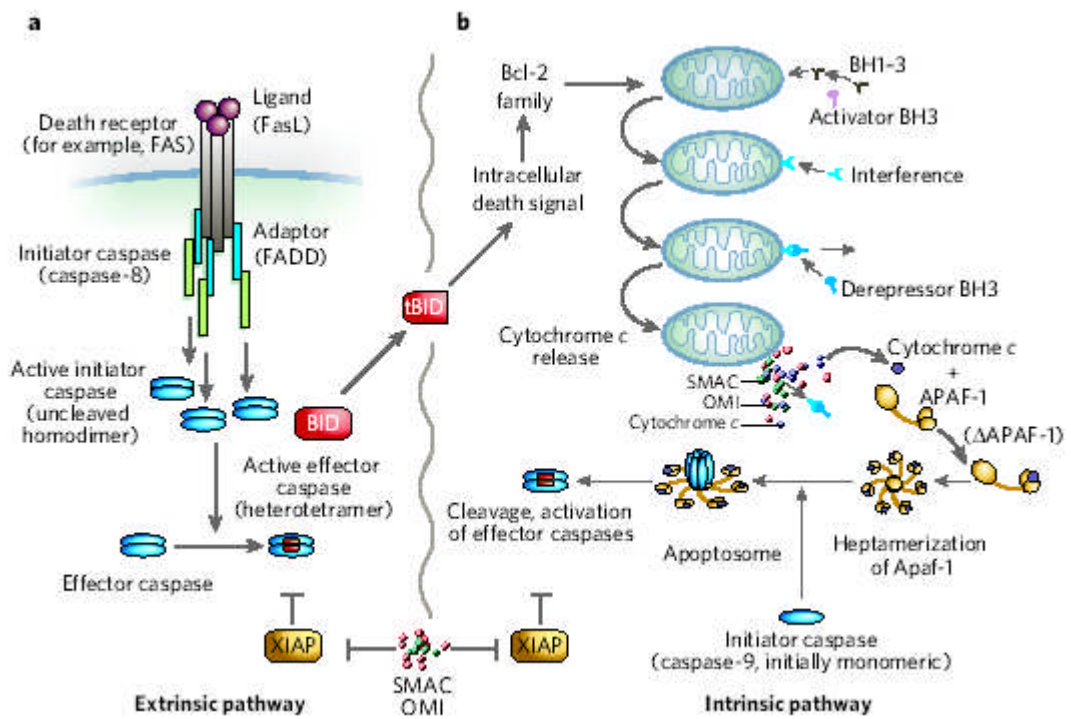
Como consecuencia de la isquemia y la reperusión, se sucede una serie de acontecimientos bioquímicos que desembocan en la muerte neuronal, que puede ocurrir de forma rápida e incontrolada (necrosis), o bien puede ser programada por la propia célula desencadenando un proceso activo que conduce al suicidio celular. Este es el caso, por ejemplo, en ciertos momentos del desarrollo del sistema nervioso o en respuesta a estímulos lesivos como deterioro en el ADN o acumulación de proteínas mal plegadas. La muerte por necrosis se acompaña del hinchamiento de las organelas celulares y edema celular, con la consiguiente ruptura de las membranas celulares y lisis, con vertido de los componentes al espacio extracelular causando edema en el tejido e induciendo la respuesta inflamatoria. La muerte celular programada, en cambio, es un proceso controlado por la célula que puede desarrollarse siguiendo distintas vías que dan lugar a varios tipos, en términos morfológicos y bioquímicos, de muerte celular

programada. La activación de una de estas vías no excluye la activación de las demás y los mecanismos que desencadenan cada una de ellas, así como las cascadas bioquímicas de que constan, son bastante desconocidos en casi todas.

La apoptosis es el tipo de muerte celular programada mejor caracterizado. Morfológicamente las células se redondean y forman burbujas, la cromatina se condensa y se fragmenta y se forman los cuerpos apoptóticos. El fosfolípido de membrana fosfatidilserina, que se encuentra normalmente en la monocapa interna de la membrana citoplasmática, en apoptosis está también en la monocapa externa (Fadok *et al.*, 1992). Estos cambios morfológicos y bioquímicos son el resultado de la activación de una serie de cisteín-aspartato-proteasas, las caspasas (Fadok *et al.*, 1992; Thornberry & Lazebnik, 1998). Hay dos vías principales de activación de la apoptosis (**figura 3**):

- la vía extrínseca, que comienza con la activación de receptores de muerte como Fas, que reclutan y activan la caspasa-8 o la caspasa-10, las cuales proteolizan y activan a su vez caspasas efectoras como la caspasa-3 y la 7 (Salvesen & Dixit, 1997).
- la vía intrínseca, en la que una señal intracelular de muerte desplaza el equilibrio existente entre las proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, lo que permeabiliza la membrana mitocondrial, provocando la salida al citosol del citocromo c y de proteínas pro-apoptóticas como SMAC, también conocida como DIABLO, u OMI, también llamada HTRA2. El citocromo c se une a la proteína citosólica APAF-1, que sufre un cambio conformacional, forma heptámeros y recluta la caspasa-9, constituyéndose así el complejo denominado apoptosoma. El apoptosoma proteoliza y activa caspasas efectoras como la caspasa-3 y la 7. Una tercera vía, también intrínseca pero originada en el retículo endoplásmico por estrés reticular, también resulta en la activación de la caspasa-9.

Tanto la vía extrínseca como la intrínseca dependen de la activación de las caspasas. Las caspasas pueden ser iniciadoras o efectoras. Las caspasas iniciadoras son reclutadas por su dominio CARD (la caspasa-9) o DED (la caspasa-8 y la 10) y dimerizan, activándose. Proteolizan las procaspasas efectoras, activándolas. Las caspasas efectoras activan cascadas proteolíticas, inactivan la reparación y activan endonucleasas que fragmentan el ADN.



**Figura 3:** Esquema representando las vías de muerte celular apoptótica. (a) vía extrínseca y (b) vía intrínseca.

## 2. MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL

Para conocer la fisiopatología de la isquemia cerebral y probar estrategias neuroprotectoras es fundamental el uso de animales de experimentación. Los más utilizados son los roedores por su facilidad de manejo, su pequeño tamaño y su bajo coste. Hay modelos de isquemia cerebral permanente y transitoria, que incluye los efectos de la reperfusión. A continuación se describen los modelos de isquemia cerebral más relevantes.

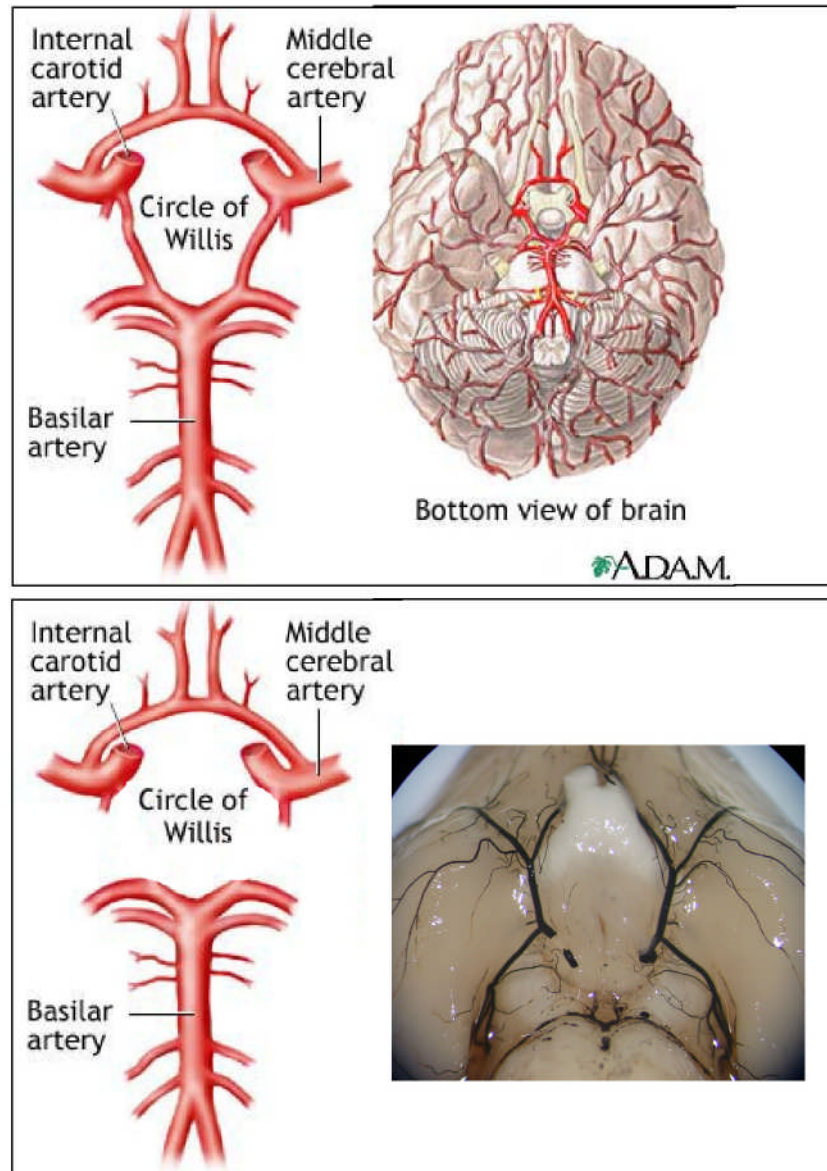
### 2.1 Isquemia cerebral focal

En los modelos de isquemia focal sólo parte del cerebro está involucrado y la isquemia es completa en el centro del área afectada. Este área de isquemia está rodeada de una zona de penumbra en la que el flujo sanguíneo está disminuido pero no ausente. La oclusión de una arteria cerebral origina el foco de muerte neuronal, glial y endotelial por necrosis, y la penumbra donde predomina la apoptosis. En la mayoría de los modelos de isquemia focal se ocluye la arteria cerebral media por una ligadura proximal (Tamura *et al.*, 1981), un coágulo de sangre autóloga (Kudo *et al.*, 1982; Overgaard *et al.*, 1992), mediante fototrombosis después de la administración intravenosa de rosa de bengala (Watson *et al.*, 1985), mediante una ligadura justo antes de la bifurcación de la arteria en las ramas frontal y parietal, (Chen *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1989), o con una sutura intraluminal (Longa *et al.*, 1989).

### 2.2 Isquemia cerebral global

En los modelos de isquemia global transitoria el cerebro entero sufre una isquemia completa seguida de reperfusión. Esto produce una muerte retardada y selectiva de neuronas especialmente vulnerables en el estrato piramidal de la capa CA1 del hipocampo. También hay varios modelos, los más utilizados son: el de oclusión de dos vasos (las arterias carótidas comunes) con hipotensión (Eklof & Siesjo, 1972), cuya variabilidad es bastante alta; el de oclusión de cuatro vasos (las arterias vertebrales y las carótidas comunes) (Pulsinelli & Brierley, 1979), que genera una elevada mortalidad; y el de oclusión de dos vasos (las arterias carótidas comunes) en el jerbo (Kirino, 1982). Los jerbos tienen una peculiaridad en la vascularización cerebral que consiste en la

ausencia de arterias comunicantes posteriores, por lo que la circulación carotídea está aislada de la vertebrobasilar (**figura 4**). Esto permite que la oclusión de las arterias carótidas comunes provoque isquemia global en la parte anterior del cerebro (Levine & Payan, 1966) y la consiguiente lesión en la capa CA1 del hipocampo. Los inconvenientes de este animal son su pequeño tamaño que dificulta la monitorización de los parámetros fisiológicos, y la tendencia a presentar crisis epilépticas (Ginsberg & Busto, 1989).



**Figura 4:** Esquema del polígono de Willis. La parte superior representa un polígono de Willis humano, que está completo. La parte inferior representa un polígono de Willis de jerbo, que está incompleto porque carece de arterias comunicantes posteriores.

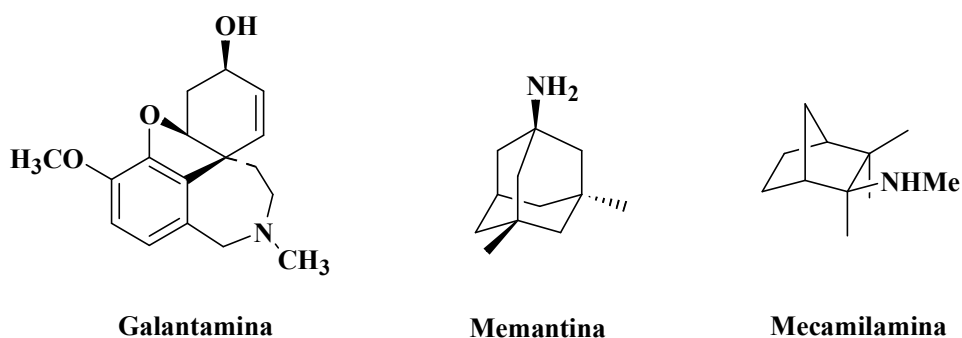
### 3. FÁRMACOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO

Hemos evaluado el potencial neuroprotector de dos fármacos que se utilizan actualmente en clínica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: la galantamina y la memantina. La enfermedad de Alzheimer se asocia con frecuencia a la enfermedad cerebrovascular, es la denominada demencia mixta, que se trata con los mismos medicamentos. Incluso en ensayos clínicos controlados en pacientes con demencia mixta Alzheimer-vascular o con demencia vascular, la galantamina ha demostrado mejorar la cognición, la memoria y las actividades de la vida diaria (Bullock *et al.*, 2004; Erkinjuntti *et al.*, 2003; Kertesz, 2002) y la memantina ha demostrado estabilizar la progresión de la demencia vascular comparado con placebo (Winblad & Poritis, 1999; Wilcock *et al.*, 2002; Orgogozo *et al.*, 2002). De ahí la idea de que estos fármacos podrían constituir tratamientos efectivos para la isquemia cerebral.

#### 3.1 Galantamina

La galantamina (**figura 5**) es un inhibidor moderado de la acetilcolinesterasa que, además, muestra potenciación alostérica del receptor nicotínico (Schrattenholz *et al.*, 1996), del receptor de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (Moriguchi *et al.*, 2004), y facilitación de la transmisión sináptica (Santos *et al.*, 2002; Schilstrom *et al.*, 2007). La galantamina se une al receptor nicotínico en un sitio alostérico, cambia su conformación y hace más eficaz la acción del agonista fisiológico acetilcolina; por tanto, en presencia de galantamina se obtiene una corriente mayor a través del receptor nicotínico, que se traduce en una mejora de la neurotransmisión colinérgica. La neurotransmisión colinérgica nicotínica está implicada en los procesos de aprendizaje y memoria (Giacobini, 1990); prueba de ello es que los agonistas nicotínicos mejoran el aprendizaje (Summers & Giacobini, 1995). Por otra parte, la galantamina, mediante su acción sobre los receptores nicotínicos presinápticos, puede facilitar la liberación de otros neurotransmisores como el glutamato, que participa en los procesos de memoria a través del fenómeno denominado potenciación perdurable o LTP (del inglés “Long Term Potentiation”). Está descrito que la galantamina actúa sobre receptores nicotínicos alfa-7 neuronales y también induce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en cultivos de células cromafines y de neuroblastoma humano, ejerciendo un efecto antiapoptótico y neuroprotector (Arias *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005) cuando se añade al

cultivo 24 h antes del estímulo tóxico. Estos hallazgos se han corroborado por Kihara y colaboradores en cultivos de neuronas corticales (2004). También se ha descrito neuroprotección por galantamina en un modelo de privación de oxígeno y glucosa en rodajas de hipocampo (Sobrado *et al.*, 2004). También se ha descrito neuroprotección por galantamina en modelos animales *in vivo* (Capsoni *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que mejora la cognición en conejos (Weible *et al.*, 2004; Woodruff-Pak *et al.*, 2001), ratas (Chopin & Briley, 1992; Fishkin *et al.*, 1993; Bores *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2000) y ratones (Gould & Feiro, 2005; Sweeney *et al.*, 1988; Van Dam & De Deyn, 2006; de Bruin & Pouzet, 2006) con déficits cognitivos, así como en ratas (Iliev *et al.*, 2000a) y jerbos sometidos a isquemia cerebral global (Ji *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Estructura química de los fármacos utilizados.

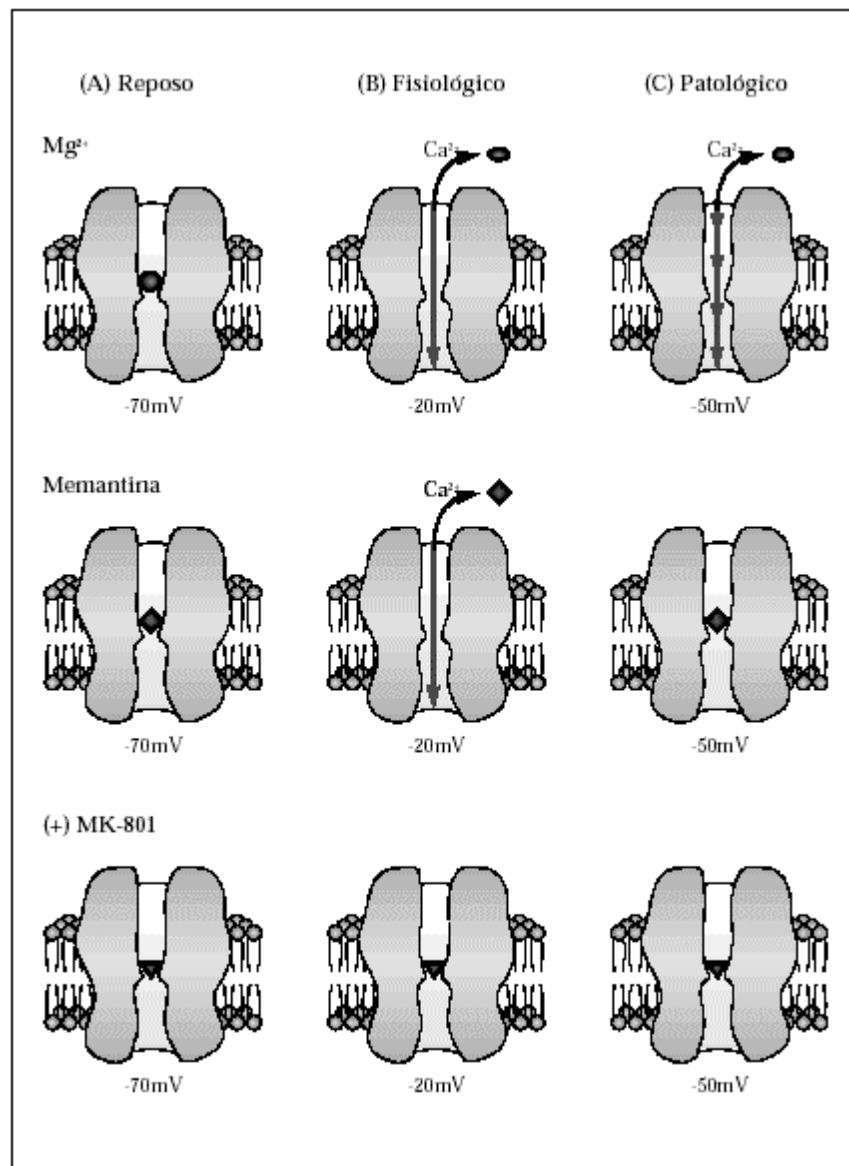
### 3.2 Memantina

La memantina (**figura 5**) es un bloqueante reversible de los receptores NMDA. Debido a su elevada permeabilidad para el Ca<sup>2+</sup>, el receptor NMDA está relacionado con numerosas funciones de plasticidad neuronal, por ejemplo, la potenciación perdurable en el hipocampo, implicada con el aprendizaje y la memoria (Bear *et al.*, 1990; Bliss & Collingridge, 1993). Sin embargo, una estimulación prolongada del receptor NMDA por un exceso de glutamato sináptico, tiene un efecto lesivo que puede conducir a la muerte neuronal; este mecanismo se ha implicado en la fisiopatología y patogenia del daño neuronal en varias enfermedades cerebrales agudas (ictus) y crónicas

(demencia vascular, demencia tipo Alzheimer) (Greenamyre *et al.*, 1988; Palmer & Gershon, 1990). No es extraño, en consecuencia, que se hayan estudiado numerosos antagonistas NMDA con la esperanza de obtener un efecto neuroprotector, tanto en cultivos neuronales como en modelos animales y en pacientes de ictus. El receptor NMDA es un canal iónico que se abre al activarse por su ligando fisiológico glutamato, o por NMDA. Para que el agonista abra el canal se requiere la acción conjunta del co-agonista glicina. Además, a potenciales de reposo fisiológicos (alrededor de  $-70$  mV), el  $Mg^{2+}$  está ocupando el poro iónico y ocluyéndolo (**figura 6A**). A menos que se produzca una despolarización, el glutamato no puede abrir el canal NMDA. Curiosamente, esta despolarización viene de la mano del glutamato que se ha liberado presinápticamente; al activar los receptores AMPA y kainato, el glutamato despolariza la neurona postsináptica, provocando la rápida salida del  $Mg^{2+}$  del canal NMDA (**figura 6B**). Así se permite que el glutamato pueda activar el receptor NMDA, favoreciendo la entrada de  $Ca^{2+}$  en la neurona postsináptica (Mayer & Westbrook, 1984; Nowak *et al.*, 1984). En reposo, la concentración de glutamato en la hendidura sináptica es alrededor de  $1 \mu M$  (Bouvier *et al.*, 1992); esta concentración puede alcanzar hasta  $1$  mM durante  $1$  ó  $2$  ms, cuando se produce la activación sináptica en condiciones fisiológicas de aprendizaje y formación de memoria (**figura 6B**) (Clements *et al.*, 1992). Los transportadores plasmalemales de glutamato, que están en neuronas y glía, recaptan con eficacia el exceso de glutamato, restaurando así con rapidez los bajos niveles de glutamato en el espacio sináptico en reposo. La depleción energética que se produce en procesos de isquemia-reperfusión o hipoxia puede ser suficiente para ralentizar la actividad del transportador de glutamato e incrementar la concentración sináptica del neurotransmisor hasta  $100 \mu M$  (Andine *et al.*, 1991). Además, la isquemia o hipoxia despolarizan discretamente la neurona, hasta unos  $-50$  mV (**figura 6C**). Con ello el  $Mg^{2+}$  deja libre el poro iónico y se produce así el desbloqueo del canal NMDA. En estas condiciones, la presencia prolongada de glutamato en la sinapsis, aunque sea a concentraciones 10 veces menores que las alcanzadas durante la activación sináptica fisiológica, va a mantener abiertos los canales NMDA; ello ocasiona una entrada mantenida de  $Ca^{2+}$  en la neurona, que produce una sobrecarga mitocondrial de  $Ca^{2+}$ , la despolarización de la mitocondria, la detención de la síntesis de ATP y la activación de la cascada apoptótica. Si la memantina bloquea el receptor NMDA que está implicado en fenómenos plásticos de aprendizaje y memoria, cabría esperar que la memantina provocase también un importante deterioro cognitivo. Ocurre justamente lo contrario.



Esto se debe a que la memantina se comporta como un “potente ión  $Mg^{2+}$ ”, con la diferencia de que durante la despolarización el  $Mg^{2+}$  abandona rápidamente el canal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, mientras que la memantina bloquea el canal sólo en situaciones patológicas, permitiendo la neurotransmisión en condiciones fisiológicas.



**Figura 4**

Esquema que representa el mecanismo de bloqueo no competitivo y voltaje-dependiente del poro iónico del receptor NMDA, por  $Mg^{2+}$ , memantina y MK-801 (adaptada de Parsons et al., 1999).

Se ha demostrado neuroprotección por memantina *in vitro* (Sobrado *et al.*, 2004; Seif *et al.*, 1990; Parsons *et al.*, 1999; Frankiewicz *et al.*, 2000; Culmsee *et al.*, 2004; Karanian *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2006; Sinn *et al.*, 2007) e *in vivo* (Parsons *et al.*, 1999; Wenk *et al.*, 1997; Stieg *et al.*, 1999; Willard *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2001; Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002), incluyendo en modelos de isquemia cerebral (Culmsee *et al.*, 2004; Gorgulu *et al.*, 2000; Backhauss & Krieglstein, 1992; Chen *et al.*, 1998; Block & Schwarz, 1996; Dogan *et al.*, 1999; Duszczuk *et al.*, 2005; Lapchak, 2006).

El primer estudio que comparó simultáneamente los efectos neuroprotectores de la galantamina y la memantina en el mismo modelo fue realizado en rodajas de hipocampo sometidas a privación de oxígeno y glucosa; en dicho estudio se demostró que los dos fármacos eran neuroprotectores, aunque la memantina fue menos potente que la galantamina (Sobrado *et al.*, 2004). El siguiente paso ha sido utilizar un modelo *in vivo* para averiguar si la galantamina o la memantina, por sí mismas y en combinación, protegen las neuronas del hipocampo de la isquemia cerebral global transitoria. Para ello, elegimos el modelo de oclusión de dos vasos en el jerbo por su reproducibilidad y por su baja tasa de mortalidad.

### **III. OBJETIVOS**

---

**OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL**

En esta tesis doctoral nos planteamos evaluar el potencial efecto neuroprotector de dos fármacos con vistas a reducir la tasa de mortalidad de las neuronas del hipocampo que se pierden tras una isquemia cerebral global. Los dos fármacos que hemos evaluado son la galantamina y la memantina, que se utilizan actualmente en clínica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer se asocia con frecuencia a la enfermedad cerebrovascular, por lo que estos fármacos podrían constituir tratamientos efectivos para la isquemia cerebral, una patología necesitada de nuevas estrategias farmacológicas. En este contexto nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto neuroprotector de la galantamina, la memantina y su combinación, administradas antes de la isquemia, sobre la viabilidad de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, en un modelo de isquemia cerebral global con reperfusión en el jerbo.
2. Evaluar el efecto neuroprotector de la galantamina, administrada post-isquemia, sobre la viabilidad de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, en un modelo de isquemia cerebral global con reperfusión en el jerbo.
3. Estudiar los posibles mecanismos implicados en el efecto protector de la galantamina, la memantina y su combinación, en concreto, la apoptosis y las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa 1 y 2.
4. Evaluar el efecto del tratamiento con galantamina y memantina sobre la memoria espacial en un modelo de isquemia cerebral global con reperfusión en el jerbo.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la realización de este estudio utilizamos jerbos macho adultos (*Meriones unguiculatus*; peso 60 a 80 g). Los animales se compraron en el centro de cría Janvier (Francia) y fueron estabulados en el animalario del servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz en jaulas individuales bajo condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa ( $48\pm 8\%$ ) y ciclo de luz de 12 h (de 7 de la mañana a 7 de la tarde), con libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos con los animales fueron realizados por personal acreditado y supervisados por el personal veterinario del centro, cumpliendo la legislación vigente para la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Directiva Europea 609/86 y Real Decreto 1201/2005).

## 1. FÁRMACOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO

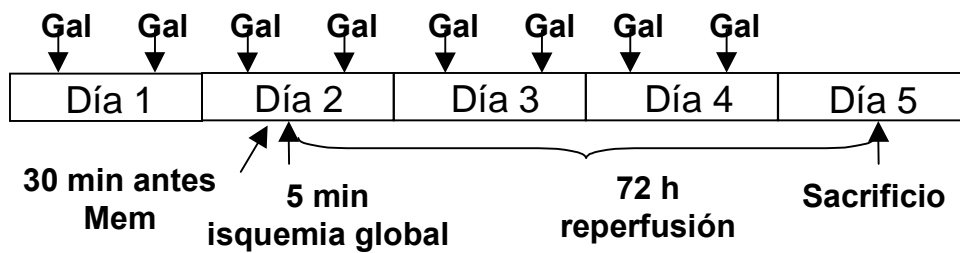
La **galantamina** fue comprada a Tocris (Bristol, Reino Unido), referencia 0686, a través de Biogen Científica (Madrid), o suministrada amablemente por Johnson and Johnson (Beerse, Bélgica). La **mecamilamina**, referencia M9020, y la **memantina**, referencia M9292, fueron compradas a Sigma-Aldrich Química (Tres Cantos, Madrid).

## 2. GRUPOS DE TRATAMIENTO Y PROTOCOLOS DE ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS

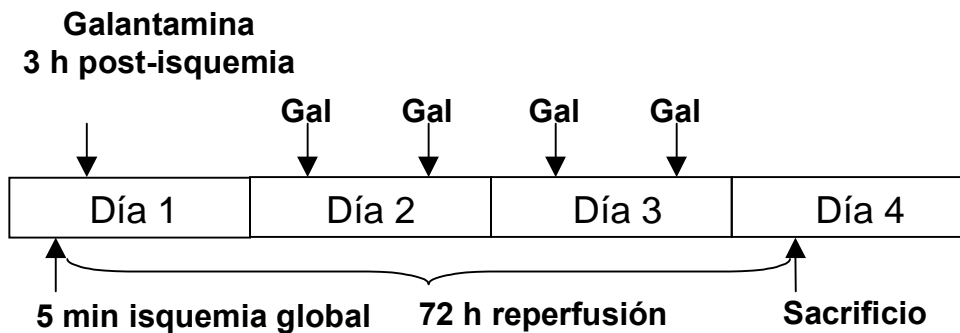
Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 22 grupos de al menos 8 animales cada uno. Comenzamos con un protocolo de administración de los fármacos en pre-tratamiento, es decir, administrándolos antes de inducir la isquemia global, para maximizar la neuroprotección farmacológica. En el caso de galantamina el pre-tratamiento fue de 24 h basándonos en los resultados descritos por Arias y colaboradores (2004); y en el caso de memantina el tratamiento fue de una única dosis 30 min antes de la isquemia, ya que su mecanismo de acción es idóneo para contrarrestar la excitotoxicidad causada por el glutamato liberado durante la isquemia y al principio de la reperfusión. Sin embargo, los experimentos para evaluar la neuroprotección farmacológica en animales adquieren mayor relevancia cuando se correlacionan con experimentos de conducta y los tratamientos son administrados después del insulto isquémico, dado que la enfermedad cerebrovascular, a pesar de ser una urgencia médica, no se logra tratar antes de 3 h o más, debido al retraso en el

traslado de los pacientes al hospital y la consiguiente tardanza en el diagnóstico. Por ello, además de evaluar el efecto de estos fármacos en un régimen de pre-tratamiento, también diseñamos protocolos de tratamiento post-isquemia, así como tests de memoria espacial, basándonos en los resultados de los experimentos de pre-tratamiento realizados previamente. Los protocolos experimentales realizados y los grupos de tratamiento establecidos fueron los siguientes (figura 7):

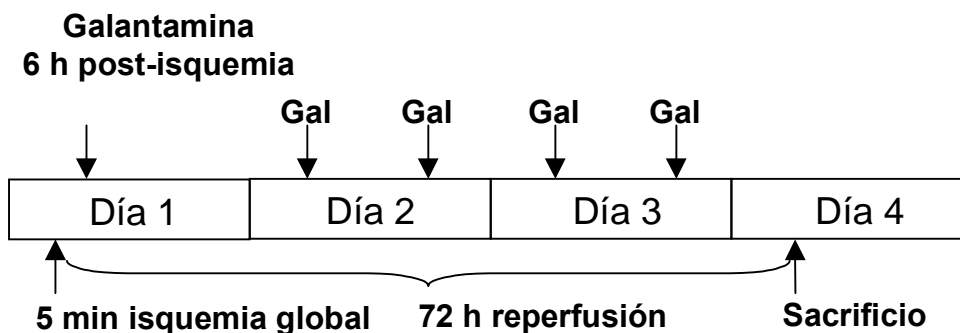
### **PROTOCOLO PRE-TRATAMIENTO**



### **PROTOCOLO TRATAMIENTO 3 H POST-ISQUEMIA**



### **PROTOCOLO TRATAMIENTO 6 H POST-ISQUEMIA**



**Figura 7:** Protocolos experimentales utilizados para evaluar el efecto neuroprotector de galantamina y memantina frente a la isquemia cerebral global transitoria.

**2.1 Protocolo de pre-tratamiento:**

- Grupo **control**: los jerbos se sometieron a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes. Los tratamientos se sustituyeron por suero salino administrado por vía subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.).
- Grupo **control + galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando el día previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.
- Grupo **control + mecamilamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con mecamilamina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 2 veces al día, comenzando el día previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.
- Grupo **isquemia**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes. Los tratamientos se sustituyeron por suero salino administrado por vía s.c. o i.p.
- Grupo **mecamilamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con mecamilamina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 2 veces al día, comenzando el día previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.
- Grupo **galantamina 1 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 1 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando el día previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.
- Grupo **galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando el día previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.
- Grupo **mecamilamina 10 mg/kg + galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando el día



previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio; y con mecamilamina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 30 min antes de cada inyección con galantamina.

- Grupo **memantina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con memantina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 30 min antes de la isquemia global.
- Grupo **memantina 20 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con memantina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 30 min antes de la isquemia global.
- Grupo **combinación de memantina 10 mg/kg + galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando el día previo a la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio; y con memantina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 30 min antes de la isquemia global.

## 2.2 Protocolo de tratamiento 3 h post-isquemia:

- Grupo **control**: los jerbos se sometieron a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes. Los tratamientos se sustituyeron por suero salino administrado por vía s.c. o i.p.
- Grupo **isquemia**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes. Los tratamientos se sustituyeron por suero salino administrado por vía s.c. o i.p.
- Grupo **galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando 3 h después de la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.
- Grupo **mecamilamina 10 mg/kg + galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando 3 h después de la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio; y con mecamilamina a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p. 30 min antes de cada inyección con galantamina.

### 2.3 Protocolo de tratamiento 6 h post-isquemia:

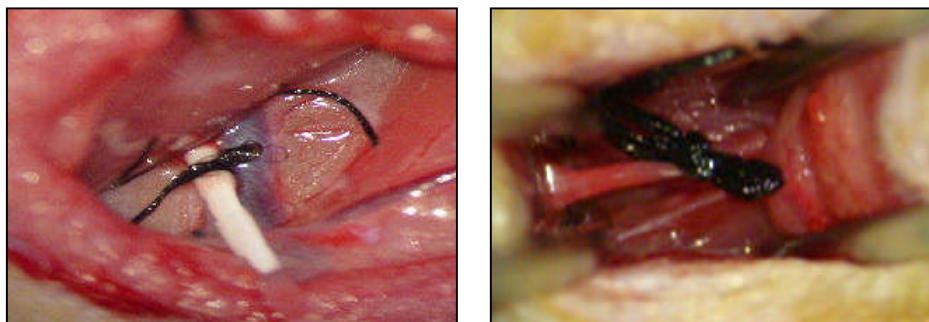
- Grupo **control**: los jerbos se sometieron a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes. Los tratamientos se sustituyeron por suero salino administrado por vía s.c. o i.p.
- Grupo **isquemia**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes. Los tratamientos se sustituyeron por suero salino administrado por vía s.c. o i.p.
- Grupo **galantamina 10 mg/kg**: los jerbos se sometieron a la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes y se trataron con galantamina a la dosis de 10 mg/kg por vía s.c. 2 veces al día, comenzando 6 h después de la isquemia global y finalizando el día previo al sacrificio.

## 3. INDUCCIÓN DE LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITORIA

Indujimos la anestesia por vía inhalatoria en una cámara con el anestésico general halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoretano, 615179-H, AstraZeneca Farmacéutica) al 5% en oxígeno a 3 l/min. Una vez que los animales estuvieron anestesiados, en 2 ó 3 min, mantuvimos la anestesia mediante una máscara con 1.5% de halotano en oxígeno a 0.75 l/min. La temperatura cerebral se mantuvo a  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  mediante una sonda de temperatura colocada en el músculo temporal y una fuente de calor (bombilla de 60 W). La temperatura corporal se mantuvo a  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  mediante una placa de calor controlada por una sonda rectal (RTC-1 Cibertec, Madrid). Se insertó un catéter de silicona polimérica (Silastic<sup>®</sup>, Medical Grade Tubing, Dow Corning, Michigan, Estados Unidos) en la arteria femoral derecha para monitorizar continuamente la presión sanguínea arterial, la frecuencia cardíaca (monitor de constantes Schiller CM-8) y la glucemia (Glucocard memory 2, Arkray, Japón; tiras reactivas DC384, Arkray, Japón). Las medidas se tomaron antes de la oclusión, 4 min después de la oclusión y a los 5 min de reperfusión.

El procedimiento quirúrgico se describe a continuación. Realizamos una incisión en la línea media a la altura del cuello, disecamos las arterias carótidas comunes y las ocluimos transitoriamente durante 5 min con suturas de seda negra de grosor 6/0 (Merksilk, Ethicon). Confirmamos visualmente la ausencia de flujo sanguíneo en ambas arterias durante la oclusión, así como la restauración del flujo tras la reperfusión, con un

microscopio estereoscópico (Leica Wild-M650). Finalmente suturamos la incisión con sutura de seda negra de grosor 4/0 (Merksilk, Ethicon). Los animales del grupo control se sometieron los mismos procedimientos excepto la oclusión de las carótidas (**figura 8**).

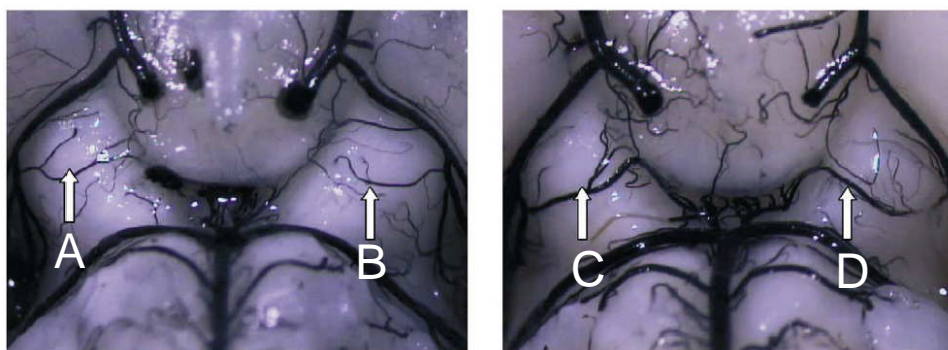


**Figura 8:** Imágenes de distintos pasos del procedimiento quirúrgico. En la fotografía de la izquierda se muestra la cateterización de la arteria femoral y en la fotografía de la derecha se muestra la oclusión de la arteria carótida común.

La variabilidad de este modelo se debe fundamentalmente a la presencia en algunos animales de arterias comunicantes posteriores de importancia (calibre  $< 50 \mu\text{m}$ ) que comunican la circulación vértebro-basilar con la carotídea. Esto conlleva que la oclusión de las arterias carótidas comunes produzca una isquemia incompleta. Para evitar este sesgo hemos utilizado varios criterios de exclusión:

1. **Signos observables durante la isquemia.** Cuando los cerebros de los animales sometidos a la oclusión de las arterias carótidas comunes están en isquemia, hay un breve periodo de respiración jadeante y movimientos corporales seguido de quiescencia, con ptosis bilateral completa y adopción de una postura encorvada (Martinez *et al.*, 2001). Los animales que no mostraron estos signos fueron excluidos del estudio.
2. **Lesión unilateral.** La isquemia global produce una pérdida selectiva de neuronas en la capa CA1 del hipocampo. En algunos casos puede aparecer asimetría en la lesión entre los hipocampos izquierdo y derecho. Los animales que sólo mostraron muerte neuronal en un hemisferio también fueron excluidos del estudio.

Estudiamos además la existencia y calibre de las arterias comunicantes posteriores en 60 jerbos para saber el porcentaje de animales con arterias comunicantes de importancia. La existencia de arterias comunicantes se puede identificar mediante la inyección transcardiaca, tras la perfusión del fijador, de 0.5 mL de tinta china (Pelikan) disuelta en 0.5 mL de gelatina (Merck) al 10% en H<sub>2</sub>O. Clasificamos el tamaño de las arterias comunicantes posteriores de cada hemisferio según una escala de valoración, adaptada de Wang y colaboradores (2002), de 0 a 3 puntos: 0, inexistente; 1, fina; 2, mediana; 3, gruesa. Puede producirse una isquemia incompleta cuando las arterias comunicantes son de grado 2 ó 3 (**figura 9**).



**Figura 9:** Fotografías de arterias comunicantes posteriores tras su tinción con tinta china mediante perfusión transcardiaca. Según su calibre se clasifican de 0 a 3. Las flechas A y B señalan arterias de grado 0, la flecha C de grado 3 y la flecha D de grado 2 (adaptado de Wang y col, 2002).

#### 4. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Para obtener una lesión estable y reproducible y poder estudiar el efecto neuroprotector de los fármacos, así como algunos de los mecanismos implicados, se debe sacrificar los animales a las 72 h de reperusión (Kirino, 1982). Aquellos animales que murieron antes de ser sacrificados no se incluyeron en el estudio. Para el sacrificio, los jerbos se anestesiaron y perfundieron por vía transcardiaca con ayuda de una bomba peristáltica (3.5 mL/min) con 100 mL de suero salino, seguidos de 100 mL de paraformaldehído recién preparado al 4%, en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4. Se

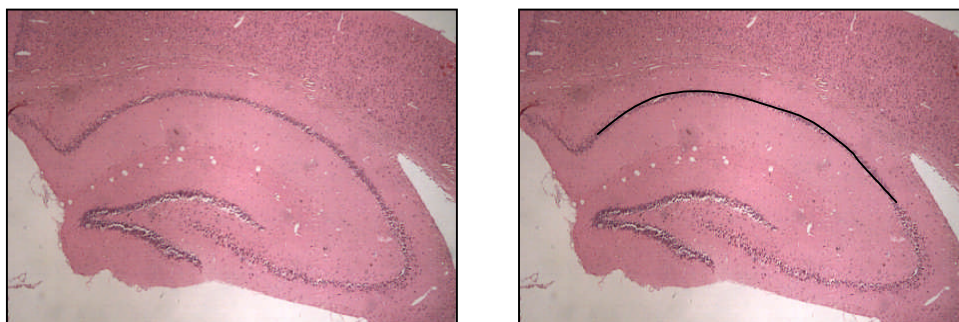
extrajeron los cerebros y se mantuvieron en la misma solución de fijación a 4°C dos días antes de ser embebidos en parafina. A continuación los seccionamos con un microtomo rotatorio (Shandon AS-325-Retraktion) en secciones coronales de 5 µm de grosor que incluyeron el hipocampo dorsal (desde 1.4 hasta 1.9 mm en sentido caudal a bregma, Loskota *et al.*, 1974). Las secciones de cerebro se colocaron sobre portaobjetos tratados con polilisina (Polysine™, Menzel GmbH & Co KG, Brunswick, Alemania) para facilitar su adhesión. A continuación se detallan las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas que se realizaron sobre las secciones para evaluar el efecto neuroprotector de los tratamientos. Se examinaron las neuronas piramidales del área CA1 dado que son las más vulnerables a la lesión por isquemia-reperfusión (Kirino, 1982).

#### **4.1 Tinción con hematoxilina-eosina**

Para evaluar la lesión en el hipocampo teñimos las secciones con hematoxilina-eosina. Para ello desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Bañamos las muestras con hematoxilina de Harris (15 min), tiñéndose así de azul las estructuras basófilas como los ácidos nucleicos, cargados negativamente (núcleos). Tras 2 lavados en agua destilada, se realizaron 6 pases rápidos en alcohol clorhídrico, un lavado en agua destilada, 4 pases rápidos en agua amoniacal y 4 lavados en agua destilada durante 20 min. A continuación bañamos las muestras en la solución de eosina-floxina durante 4 min, tiñéndose así de rosa el citoplasma y demás estructuras acidófilas. Las muestras se deshidrataron en alcohol de 96 y de 100°, se bañaron en xilol durante 5 min y se montaron las muestras con DePeX.

Determinamos la lesión en el hipocampo contando el número de neuronas viables en el *stratum pyramidale* en el área CA1 dorsal con un aumento de 1000X (Zeiss Axioplan) en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Las neuronas con retracción del cuerpo celular o picnóticas no se consideraron viables y no fueron contabilizadas. Medimos la longitud del área CA1 con un programa de análisis de imagen (Image ProPlus®) para normalizar los datos (**figura 10**) y calculamos para ambos hemisferios el número de neuronas piramidales viables en CA1 por milímetro de

longitud. Analizamos dos secciones de cada animal y calculamos la media. La evaluación de las secciones histológicas se realizó de forma ciega.



**Figura 10:** Fotografías de una sección coronal de cerebro teñida con hematoxilina-eosina. En la foto derecha se ha delineado el área CA1 para realizar la medición con un programa de análisis de imagen.

#### 4.2 Tinción de TUNEL

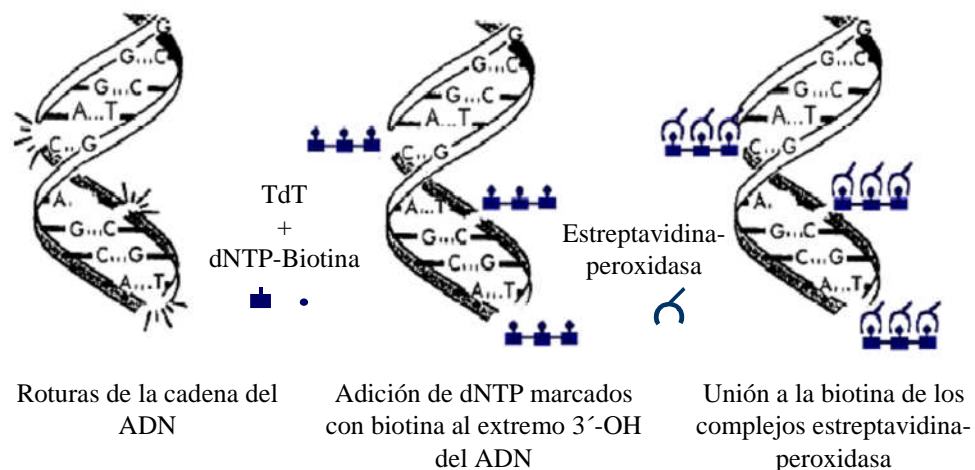
Detectamos el ADN fragmentado en nuestras muestras mediante un kit de marcaje *in situ* de los extremos 3'OH (marcaje mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal de los extremos 3'OH con dUTP conjugado con biotina; [TUNEL] TdT-FragEL DNA fragmentation detection kit, Oncogene Research Products).

El principio del ensayo consiste en la adición de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) conjugados con biotina a los extremos 3'OH de los fragmentos de ADN, en una reacción catalizada por la enzima deoxirribonucleotidil transferasa terminal (TdT) (**figura 11**).

Desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Permeabilizamos las membranas con proteinasa K 30 min a temperatura ambiente. A continuación inactivamos la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol 5 min y colocamos las muestras en tampón de equilibrio (tris 0.15 M y 1.5 mg/mL de seroalbúmina bovina [BSA]). Transcurridos 30 min incubamos las muestras

con la TdT y la mezcla de marcaje que incluye los dNTP biotinilados (dilución 1:20) a 37°C durante 90 min. Terminada la reacción de marcaje con el tampón de parada (0.5 M EDTA, pH 8) bloqueamos con BSA al 4% en tampón fosfato e incubamos las muestras con el complejo estreptavidina-peroxidasa en tampón de bloqueo (dilución 1:25). Finalmente, visualizamos la reacción mediante la diaminobenzidina (DAB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La DAB reacciona con las muestras marcadas dando lugar a un sustrato insoluble de color marrón. Contrateñimos las muestras con verde metilo para ver las células TUNEL negativas. Por último se realizaron 3 pases rápidos en alcohol de 100°, se bañaron las muestras en xilol durante 5 min y se montaron las muestras con DePeX. Todos los lavados de las muestras los realizamos con tampón tris salino (20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl). Para realizar los controles negativos, las secciones se incubaron sin la enzima. Los núcleos normales que tuvieron un número relativamente insignificante de extremos 3'OH del ADN no se tiñeron.

Cuantificamos la fragmentación del ADN contando las neuronas positivas en el *stratum pyramidale* del área CA1 dorsal de ambos hemisferios con un aumento de 1000X. Normalizamos los datos por 1 mm de longitud de CA1 utilizando un programa de análisis de imagen (Image ProPlus®).



**Figura 11:** Fundamento de la técnica TUNEL: reacción de adición de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) conjugados con biotina a los extremos 3'OH de los fragmentos de ADN catalizada por la enzima deoxirribonucleotidil transferasa terminal (TdT).

### **4.3 Inmunohistoquímica y análisis de procaspasa-3**

Desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Para desenmascarar los antígenos sumergimos las muestras durante 20 min en tampón citrato 0.01 M pH 6.0 hirviendo y las dejamos enfriar otros 20 min. Seguidamente bloqueamos con seroalbúmina bovina (BSA) al 1.5% en TBS y las incubamos 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (generado en conejo frente a la procaspasa-3 humana, Sana Cruz, dilución 1:200). Para inhibir la peroxidasa endógena sumergimos las secciones en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol. La inmunorreactividad se visualizó incubando con un anticuerpo secundario universal biotilado (1:200) durante 1 h seguido del complejo estreptavidina-peroxidasa (Vectastatin<sup>®</sup> Universal Quick Kit, Vector Laboratories) y diaminobenzidina al 0.06%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2%. Contrateñimos las muestras con hematoxilina para ver las células procaspasa-3 negativas. Las muestras se deshidrataron en alcoholes a porcentajes crecientes (70°, 80°, 90°, 100°), se bañaron en xilol durante 5 min y se montaron las muestras con DePeX. Todos los lavados de las muestras los realizamos con tampón tris salino (20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl). Para realizar los controles negativos, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario.

Cuantificamos la inmunorreactividad contando las neuronas positivas en el *stratum pyramidale* del área CA1 dorsal de ambos hemisferios con un aumento de 1000X. Normalizamos los datos por 1 mm de longitud de CA1 utilizando un programa de análisis de imagen (Image ProPlus<sup>®</sup>).

### **4.4 Inmunohistoquímica y análisis de caspasa-3 activa**

Desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Para desenmascarar los antígenos sumergimos las muestras durante 20 min en tampón citrato 0.01 M pH 6.0 hirviendo y las dejamos enfriar otros 20 min. Seguidamente bloqueamos con seroalbúmina bovina (BSA) al 1.5% en TBS y las incubamos 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (generado en conejo frente a la caspasa-3 activa de ratón, Alexis Biochemicals, dilución 1:10). Para inhibir la



peroxidasa endógena sumergimos las secciones en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol. La inmunorreactividad se visualizó incubando con un anticuerpo secundario universal biotinilado (1:200) durante 1 h seguido del complejo estreptavidina-peroxidasa (Vectastatin<sup>®</sup> Universal Quick Kit, Vector Laboratories) y diaminobenzidina al 0.06%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2%. Contrateñimos las muestras con hematoxilina para ver las células caspasa-3 negativas. Las muestras se deshidrataron en alcoholes a porcentajes crecientes (70°, 80°, 90°, 100°), se bañaron en xilol durante 5 min y se montaron las muestras con DePeX. Todos los lavados de las muestras los realizamos con tampón tris salino (20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl). Para realizar los controles negativos, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario.

Cuantificamos la inmunorreactividad contando las neuronas positivas en el *stratum pyramidale* del área CA1 dorsal de ambos hemisferios con un aumento de 1000X. Normalizamos los datos por 1 mm de longitud de CA1 utilizando un programa de análisis de imagen (Image ProPlus<sup>®</sup>).

#### **4.5 Inmunohistoquímica y análisis de SOD-1**

Desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Para inhibir la peroxidasa endógena sumergimos las secciones en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol. Seguidamente bloqueamos con seroalbúmina bovina al 1.5% en TBS e incubamos las muestras a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario (generado en conejo frente a la SOD-1 de rata, Stressgen, dilución 1:500). La inmunorreactividad se visualizó incubando con un anticuerpo secundario universal biotinilado (1:200) durante 1 h seguido del complejo estreptavidina-peroxidasa (Vectastatin<sup>®</sup> Universal Quick Kit, Vector Laboratories) y diaminobenzidina al 0.06%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2%. Contrateñimos las muestras con verde metilo para ver las células SOD-1 negativas. Por último se realizaron 3 pases rápidos en alcohol de 100°, se bañaron las muestras en xilol durante 5 min y se montaron las muestras con DePeX. Todos los lavados de las muestras los realizamos con tampón tris salino (20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl). Para realizar los controles negativos, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario.

Cuantificamos la inmunorreactividad contando las neuronas positivas en el *stratum pyramidale* del área CA1 dorsal de ambos hemisferios con un aumento de 1000X. Normalizamos los datos por 1 mm de longitud de CA1 utilizando un programa de análisis de imagen (Image ProPlus®).

#### **4.6 Inmunohistoquímica y análisis de SOD-2**

Desparafinamos las muestras en xilol durante 10 min, las rehidratamos en alcoholes a porcentajes decrecientes (100°, 90°, 80°, 70°) y las lavamos en agua destilada. Para desenmascarar los antígenos sumergimos las muestras durante 20 min en tampón citrato 0.01 M pH 6.0 hirviendo y las dejamos enfriar otros 20 min. Seguidamente bloqueamos con seroalbúmina bovina al 1.5% en TBS e incubamos las muestras a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario (generado en conejo frente a la SOD-2 de rata, Stressgen, dilución 1:100). Para inhibir la peroxidasa endógena sumergimos las secciones en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol. La inmunorreactividad se visualizó incubando con un anticuerpo secundario universal biotinilado (1:200) durante 1 h seguido del complejo estreptavidina-peroxidasa (Vectastatin® Universal Quick Kit, Vector Laboratories) y diaminobenzidina al 0.06%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2%. Contrateñimos las muestras con hematoxilina para ver las células SOD-2 negativas. Las muestras se deshidrataron en alcoholes a porcentajes crecientes (70°, 80°, 90°, 100°), se bañaron en xilol durante 5 min y se montaron las muestras con DePeX. Todos los lavados de las muestras los realizamos con tampón tris salino (20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl). Para realizar los controles negativos, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario.

Cuantificamos la inmunorreactividad contando las neuronas positivas en el *stratum pyramidale* del área CA1 dorsal de ambos hemisferios con un aumento de 1000X. Normalizamos los datos por 1 mm de longitud de CA1 utilizando un programa de análisis de imagen (Image ProPlus®).

#### **5. WESTERN BLOT DE CASPASA-3, SOD-1 Y SOD-2 EN EXTRACTOS DE HIPOCAMPO**

Para corroborar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, analizamos las proteínas por western blot. Para ello utilizamos tejido fresco en lugar de tejido fijado. Los jerbos fueron anestesiados y decapitados con una guillotina. Extrajimos rápidamente los hipocampos y los congelamos en nitrógeno líquido. Resuspendimos las muestras en Tris/HCl (50 mM, pH 7.8), EDTA (1 mM), DTT (1 mM), PMSF (100 µg/ml), pepstatina A (2 µg/ml), leupeptina (2 µg/ml), inhibidor de tripsina (10 µg/ml), benzamidina (0.2 mM) y las disociamos mecánicamente. Medimos la concentración total de proteína mediante el ensayo de proteína BCA (Pierce) y corrimos cantidades equivalentes de proteína en un gel de electroforesis de poliacrilamida al 10% o al 15%. Transferimos las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Pall; Life Sciences) y bloqueamos con leche desnatada en polvo al 5% en TBS con Tween 20 al 0.05% durante 1 h. Seguidamente incubamos a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios (generado en conejo frente a la procaspasa-3, Santa Cruz, dilución 1:100; generado en conejo frente a la caspasa-3 activa, Cell Signaling, dilución 1:500; generado en conejo frente a la SOD-1, Stressgen, dilución 1:50000; generado en conejo frente a la SOD-2, Stressgen, dilución 1:50000). Utilizamos la  $\beta$ -actina como control de carga de proteína (anticuerpo generado en ratón frente a la  $\beta$ -actina, Sigma, dilución 1:10000). Incubamos las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-conejo o anti-ratón, Santa Cruz, CA, dilución 1:5000). Detectamos la quimioluminiscencia con un kit de detección de ECL western blot (Amersham Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

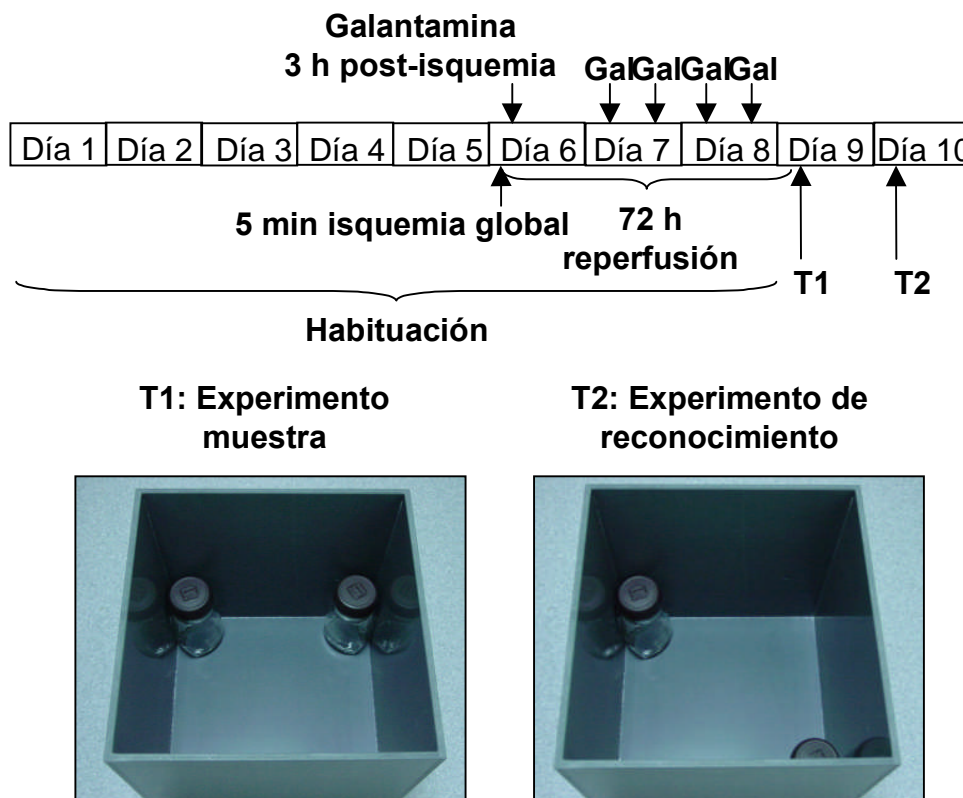
## **6. TEST DE LOCALIZACIÓN DE OBJETOS**

El test de localización de objetos es una tarea de memoria espacial que depende del hipocampo. Está basado en la tendencia espontánea y natural de los roedores a explorar la novedad. El método de localización de objetos que utilizamos en esta tesis se adaptó para los jerbos a partir de los métodos utilizados en ratas (Ennaceur *et al.*, 1997).

Introdujimos a los animales 5 min al día en un campo (una caja cúbica de 40 cm de lado, de PVC gris) los cinco días previos al día de la isquemia y los dos días posteriores para reducir su ansiedad. A las 72 h de reperusión introdujimos a los animales en el campo con dos objetos idénticos (botellas de vidrio cilíndricas lo

suficientemente pesadas como para evitar que los animales las movieran; altura: 22 cm, diámetro: 9 cm) y les permitimos explorarlas durante 30 s (T1, experimento muestra). Cronometramos la exploración de los objetos cuando los animales olisquean, tocan con los bigotes o miran los objetos a menos de 2 cm de distancia. Al día siguiente cambiamos uno de los objetos a un nuevo lugar. Observamos y cronometramos durante 3 min el tiempo que emplean explorando los objetos en la localización nueva y en la familiar (T2, experimento de reconocimiento) (**figura 12**). Equilibramos entre los grupos las localizaciones de los objetos y el campo se limpió con ácido acético al 0.1% entre cada experimento para borrar las pistas olfativas.

Utilizamos el tiempo de conducta exploratoria para calcular un índice de memoria (IM), tal como describieron Blalock y colaboradores (2003):  $IM = (N - F) / (N + F)$ , donde N es el tiempo empleado en explorar el objeto en la localización nueva y F es el tiempo empleado en explorar el objeto en la localización familiar. Por lo tanto cuanto mayor sea IM, mejor memoria tendrán los animales.



**Figura 12:** Protocolo experimental del test de localización de objetos, que sirve para evaluar la memoria espacial dependiente del hipocampo.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Realizamos el análisis estadístico con el asesoramiento del Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 10.0 para windows.

Expresamos los resultados como medias aritméticas  $\pm$  error estándar de la media. Determinamos las diferencias estadísticas con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test *post hoc* de Bonferroni. Consideramos las diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **V. RESULTADOS**

---

## 1. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Los parámetros fisiológicos, que incluyeron la presión sanguínea arterial, la frecuencia cardiaca y la glucosa en sangre arterial, permanecieron en los niveles normales y no mostraron diferencias significativas entre los grupos antes, durante o después de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes, a excepción de la presión arterial que ascendió en todos los grupos durante la isquemia debido a la oclusión de las arterias, excepto en los grupos control (**tabla 1**). Este modelo de isquemia global no produce una alta mortalidad. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad entre los grupos experimentales.

Parámetros	Grupos	Basal	Oclusión	Reperusión
Presión sanguínea arterial media (mm Hg)	Sham	74.1 ± 2.9	72.1 ± 2.7 *	70.0 ± 2.8
	Sham + Gal 10	75.3 ± 2.1	73.5 ± 1.9	71.3 ± 1.5
	Sham + Meca 10	74.7 ± 1.2	73.2 ± 1.6	71.0 ± 2.1
	Isquemia	78.0 ± 2.6	111.0 ± 3.9	75.4 ± 2.8
	Mecamilamina 10 mg/kg	73.4 ± 1.8	105.0 ± 1.7	74.4 ± 3.3
	Galantamina 1 mg/kg	73.4 ± 5.3	99.1 ± 3.6	72.8 ± 2.1
	Galantamina 10 mg/kg	74.9 ± 1.6	99.4 ± 2.1	71.0 ± 2.4
	Meca 10 + Gal 10	76.3 ± 2.6	104.9 ± 3.6	75.3 ± 3.3
	Memantina 10 mg/kg	73.4 ± 3.9	99.0 ± 5.3	71.9 ± 1.8
	Memantina 20 mg/kg	75.1 ± 3.2	101.9 ± 4.1	69.1 ± 3.6
	Gal 10 + Mem 10	70.1 ± 4.1	102.9 ± 4.5	64.3 ± 3.0
Frecuencia cardiaca (lpm)	Sham	337.5 ± 24.4	315.0 ± 12.0	281.3 ± 10.0
	Sham + Gal 10	325.6 ± 14.3	303.6 ± 13.5	273.5 ± 12.7
	Sham + Meca 10	332.3 ± 17.2	319.8 ± 12.4	270.9 ± 18.2
	Isquemia	368.6 ± 20.9	360.0 ± 18.5	336.4 ± 19.9
	Mecamilamina 10 mg/kg	309.0 ± 13.9	326.3 ± 10.1	306.0 ± 12.2
	Galantamina 1 mg/kg	306.4 ± 22.6	335.6 ± 22.8	313.1 ± 15.6
	Galantamina 10 mg/kg	303.8 ± 10.0	361.9 ± 24.8	291.4 ± 16.7
	Mecamilamina + Gal 10	298.1 ± 10.4	307.5 ± 13.6	320.6 ± 19.6
	Memantina 10 mg/kg	300.0 ± 16.0	302.1 ± 25.0	317.1 ± 21.3
	Memantina 20 mg/kg	301.9 ± 24.3	288.8 ± 16.2	296.3 ± 10.5
	Gal 10 + Mem 10	266.3 ± 16.6	267.0 ± 27.8	240.0 ± 10.1
Glucosa sanguínea arterial (mg/dl)	Sham	99.9 ± 7.0	103.0 ± 5.1	104.4 ± 5.5
	Sham + Gal 10	85.9 ± 5.2	90.5 ± 6.3	89.5 ± 4.3
	Sham + Meca 10	101.0 ± 6.4	105.2 ± 5.6	98.2 ± 4.8
	Isquemia	79.9 ± 4.4	110.5 ± 8.4	107.4 ± 5.5
	Mecamilamina 10 mg/kg	113.0 ± 9.9	124.4 ± 9.9	122.4 ± 6.1
	Galantamina 1 mg/kg	108.4 ± 6.6	124.3 ± 9.4	110.0 ± 7.8
	Galantamina 10 mg/kg	114.0 ± 9.4	126.4 ± 7.1	122.7 ± 8.2
	Mecamilamina + Gal 10	82.1 ± 8.5	107.6 ± 7.9	107.1 ± 7.9
	Memantina 10 mg/kg	86.3 ± 4.4	110.1 ± 5.5	91.0 ± 3.2
	Memantina 20 mg/kg	92.0 ± 1.9	112.9 ± 4.0	98.0 ± 5.6
	Gal 10 + Mem 10	105.0 ± 9.8	114.0 ± 9.3	109.5 ± 7.7

**Tabla 1:** Parámetros fisiológicos

## **2. EXISTENCIA Y CALIBRE DE LAS ARTERIAS COMUNICANTES POSTERIORES**

Al evaluar la existencia y calibre de las arterias comunicantes posteriores en 60 animales, un 30% de ellos presentó arterias de un calibre importante ( $< 50 \mu\text{m}$ ), siendo clasificados con grado 3 o mayor.

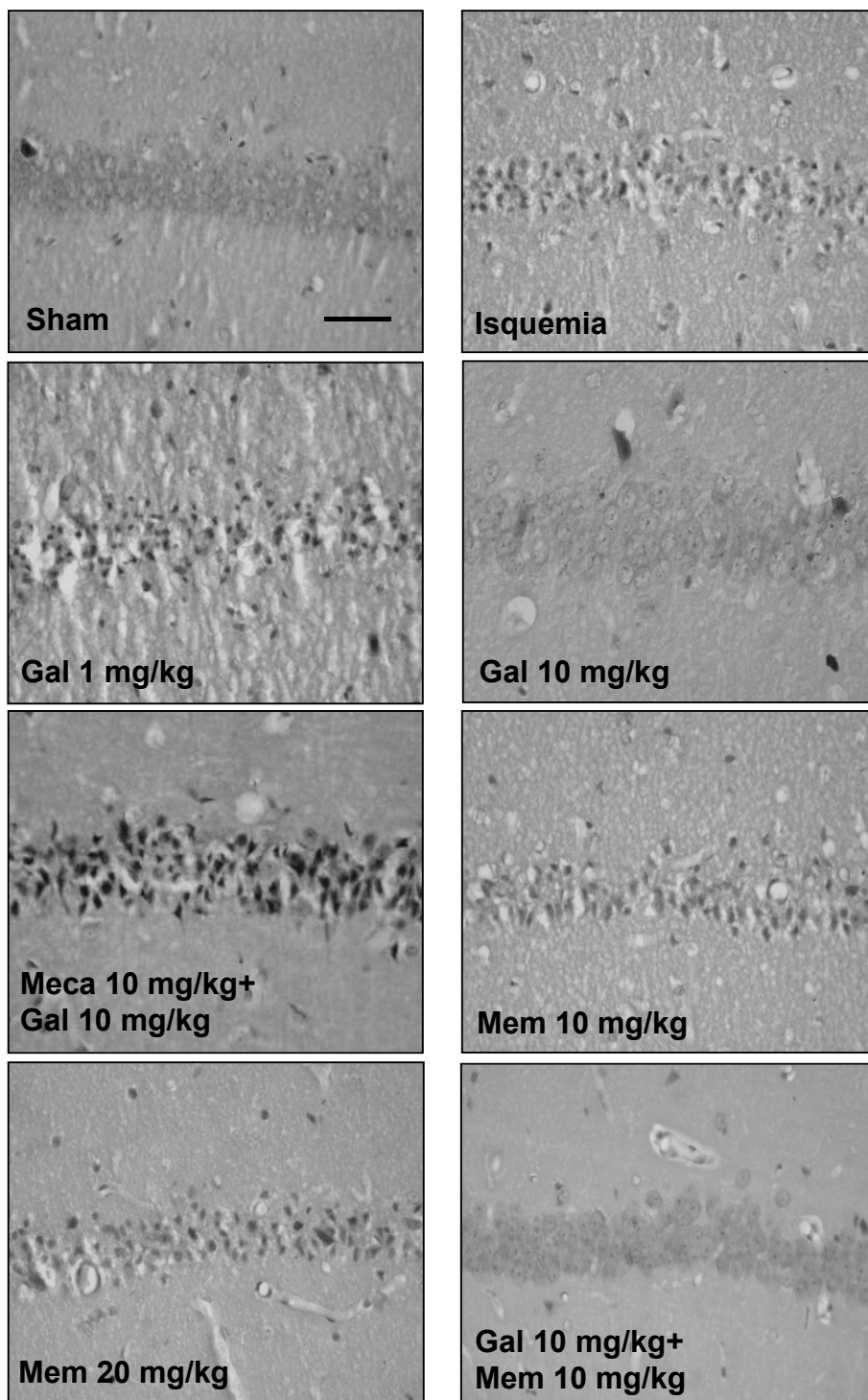
## **3. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL PRE-TRATAMIENTO CON GALANTAMINA Y SU COMBINACIÓN CON MEMANTINA FRENTE A LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL**

La evaluación de la lesión en el hipocampo causada por la isquemia global en este modelo ofrece una medida cuantitativa de la eficacia de la intervención farmacológica. El índice usado para detectar diferencias en la lesión producida viene dado por el número de neuronas piramidales viables en CA1 por milímetro de longitud en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

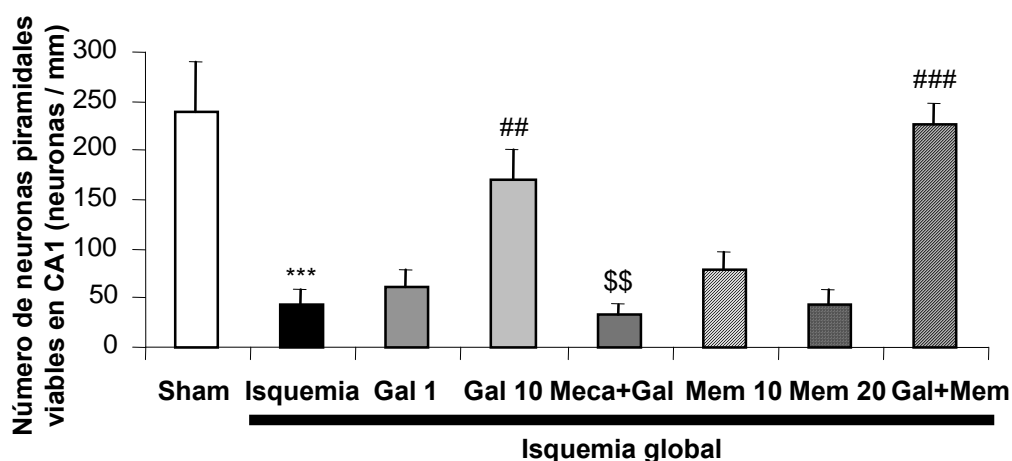
Imágenes representativas de los principales grupos de tratamiento se muestran en la **figura 13** y los datos obtenidos en la **figura 14**. Los animales del grupo control mostraron  $239 \pm 51.8$  neuronas viables/mm. Es notable la pronunciada pérdida neuronal producida por la isquemia, que redujo el número de neuronas hasta  $43 \pm 15.1$  neuronas/mm. La neuroprotección ejercida por la galantamina fue dosis-dependiente. A la dosis de 1 mg/kg, la galantamina no aumentó significativamente el número de neuronas viables/mm ( $61 \pm 18.8$ ) mientras que a la dosis de 10 mg/kg se observaron  $171 \pm 30.2$  neuronas/mm. El tratamiento con el antagonista nicotínico mecamilamina bloqueó el efecto neuroprotector obtenido con la galantamina ( $34 \pm 8.5$  neuronas/mm).

Los animales tratados con el antagonista de receptores NMDA memantina no mostraron neuroprotección a la dosis de 10 mg/kg ( $78 \pm 19.9$  neuronas/mm) ni a la de 20 mg/kg ( $43 \pm 15.7$  neuronas/mm). Sin embargo, la combinación de galantamina 10 mg/kg con memantina 10 mg/kg aumentó el número de neuronas viables/mm hasta  $227 \pm 20$ , valor parecido al de los animales del grupo control.





**Figura 13: Efecto neuroprotector del pretratamiento con galantamina y su combinación con memantina.** Microfotografías del estrato piramidal de CA1 teñido con hematoxilina y eosina de los grupos experimentales indicados en cada fotografía. Barra de calibración de 40 µm.



**Figura 14: Efecto neuroprotector del pretratamiento con galantamina y su combinación con memantina.** Histograma con los datos de cada grupo experimental ( $n = 8$ ) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con sham; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia; ### $p < 0.001$  comparado con isquemia; \$\$ $p < 0.01$  comparado con galantamina 10 mg/kg.

De los datos anteriores se desprende que la galantamina a la dosis de 10 mg/kg alcanzó el 72% del número de neuronas viables del grupo control, y la combinación de 10 mg/kg de galantamina con 10 mg/kg de memantina alcanzó el 95%.

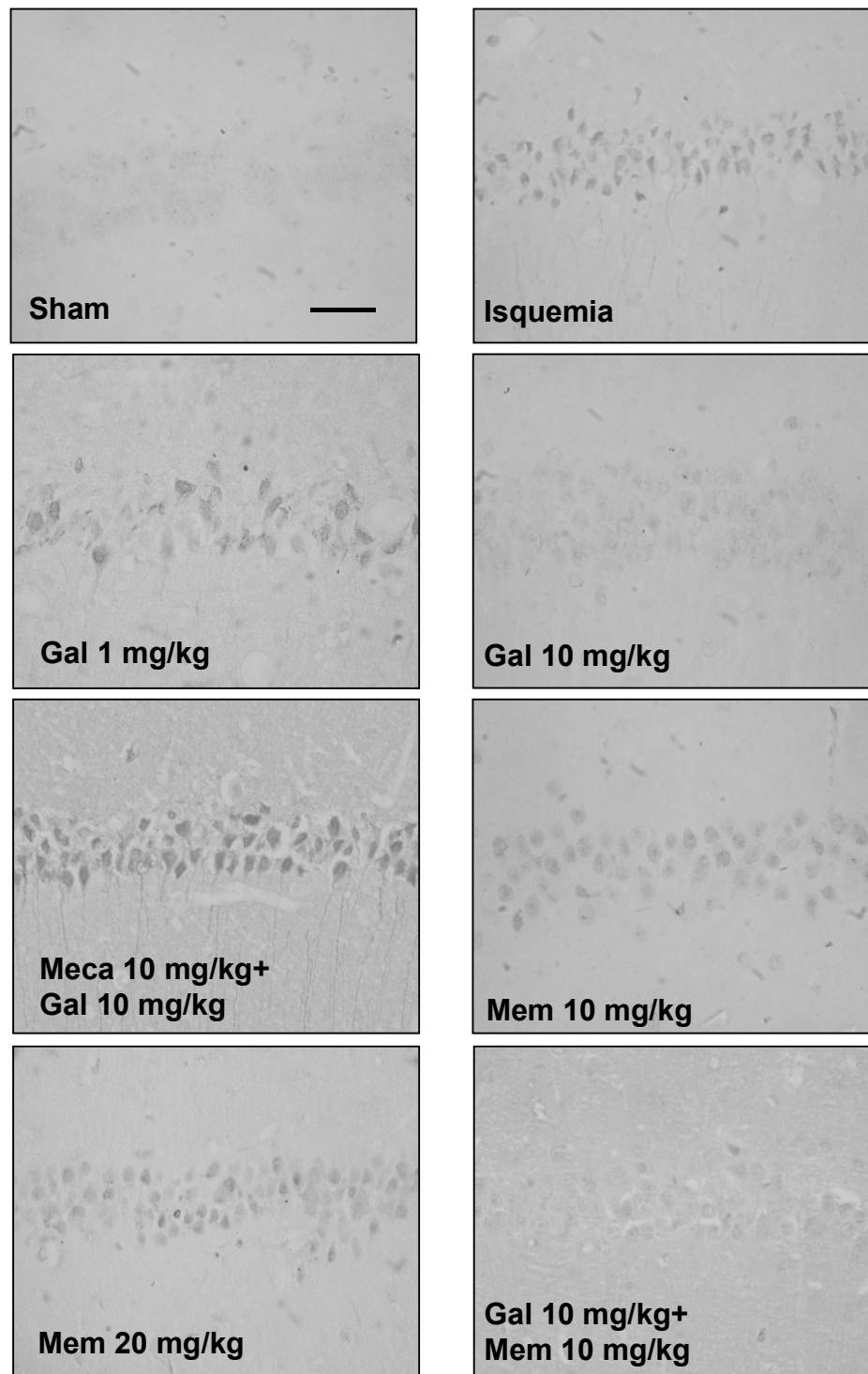
Realizamos varios grupos control para excluir posibles efectos de los fármacos sobre el número de neuronas piramidales viables. Estos grupos incluyeron animales control tratados con mecamilamina ( $230 \pm 33.8$  neuronas/mm), animales control tratados con galantamina ( $252 \pm 9.4$  neuronas/mm), y animales sometidos a isquemia tratados con mecamilamina ( $30 \pm 20.0$  neuronas/mm); ninguno de estos grupos presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a sus respectivos controles.

#### 4. POSIBLES MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR

#### **4.1 Los tratamientos disminuyeron la fragmentación del ADN en las neuronas piramidales de CA1. Implicación de la activación del receptor nicotínico.**

Imágenes representativas de los principales grupos de tratamiento se muestran en la **figura 15** y los datos obtenidos en la **figura 16**. Los animales del grupo control apenas mostraron neuronas positivas al TUNEL ( $1\pm 0.4$  neuronas/mm); sin embargo, en el grupo isquemia observamos un aumento muy notorio de la fragmentación del ADN ( $252\pm 42.4$  neuronas/mm). El tratamiento con galantamina redujo la fragmentación del ADN de manera dosis-dependiente: con 1 mg/kg de galantamina el número de neuronas positivas al TUNEL fue  $60\pm 22.9$ , y con 10 mg/kg obtuvimos  $7\pm 4.9$  neuronas/mm, prácticamente los valores observados en el grupo control. El efecto neuroprotector de la galantamina se perdió en los animales que recibieron mecamilamina además de galantamina ( $174\pm 19.6$  neuronas/mm). Este resultado sugiere que la prevención de la fragmentación del ADN observada en los animales tratados con galantamina está mediada por receptores nicotínicos.

El tratamiento con memantina también redujo la fragmentación del ADN: con 10 mg/kg observamos  $44\pm 14.9$  neuronas/mm, y con 20 mg/kg observamos  $107\pm 35.4$  neuronas/mm. La dosis más efectiva, por tanto, volvió a ser la de 10 mg/kg. El tratamiento con la combinación de galantamina 10 mg/kg y memantina 10 mg/kg redujo la fragmentación a  $0\pm 0.1$  neuronas/mm, prácticamente los valores observados en el grupo control.



**Figura 15: Galantamina, memantina y su combinación reducen la fragmentación del ADN en las neuronas piramidales de CA1. Microfotografías del estrato piramidal de CA1 teñido con TUNEL de los grupos experimentales indicados en cada fotografía. Barra de calibración de 40 µm.**

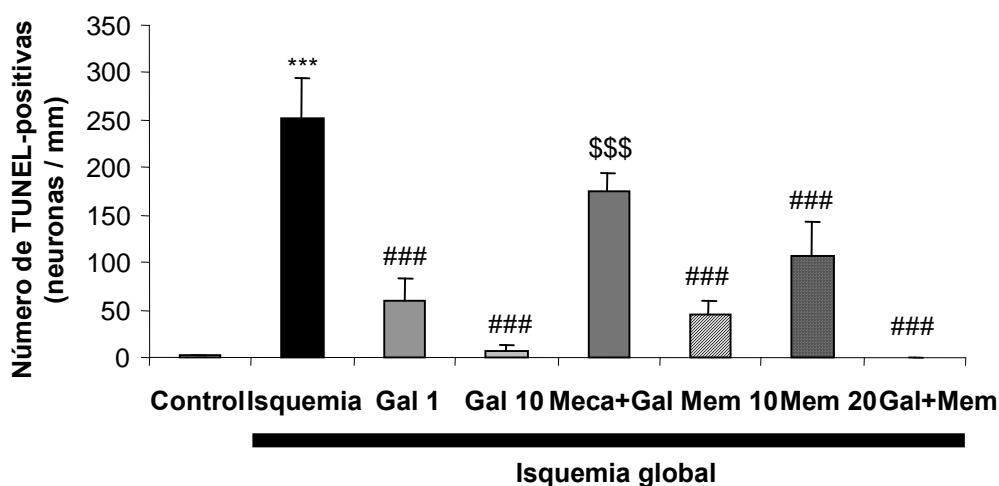


Figura 16: Galantamina, memantina y su combinación reducen la fragmentación del ADN en las neuronas piramidales de CA1. **Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\*p<0.001 comparado con control; ###p<0.001 comparado con isquemia; \$\$\$p<0.001 comparado con galantamina 10 mg/kg.**

#### 4.2 Los tratamientos disminuyeron la expresión de caspasa-3 en el hipocampo independientemente de la activación del receptor nicotínico.

La fragmentación del ADN se relaciona con la apoptosis. Sin embargo la técnica de TUNEL también puede teñir células necróticas. Por ello, analizamos otro parámetro adicional relacionado con la apoptosis: la caspasa-3. Medimos la expresión de la proteína, tanto del zimógeno como de la forma activa, en las neuronas piramidales de CA1 por inmunohistoquímica, y en el hipocampo entero, incluyendo CA1, CA3 y giro dentado, por western blot.

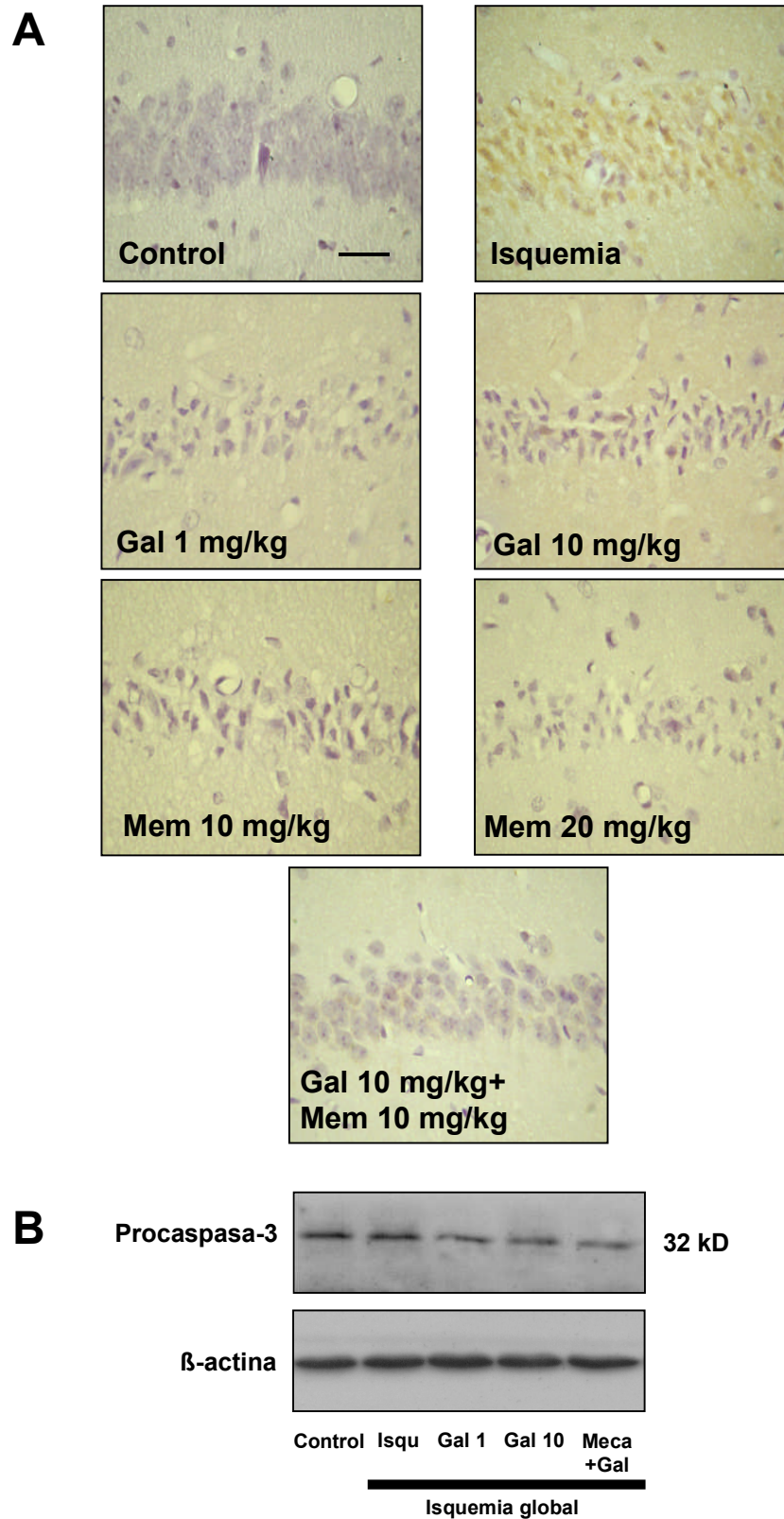
Imágenes representativas de los principales grupos de tratamiento, así como el western blot, se muestran en la **figura 17**; los datos obtenidos se muestran en la **figura 18**. Los animales del grupo control apenas mostraron neuronas positivas ( $1 \pm 0.7$  neuronas/mm); sin embargo, la isquemia produjo un aumento muy notorio en la expresión de procaspasa-3 ( $37 \pm 8.1$  neuronas/mm). El tratamiento con galantamina redujo los niveles de procaspasa-3: con 1 mg/kg de galantamina el número de neuronas positivas fue  $3 \pm 2.4$ , y con 10 mg/kg obtuvimos  $8 \pm 4.4$  neuronas/mm, prácticamente los valores observados en el grupo control. El western blot de procaspasa-3 mostró en el

grupo control unos niveles de proteína similares a los del grupo isquemia; la expresión de esta proteína se redujo en gran medida en los grupos tratados con galantamina y la mecamilamina no bloqueó el efecto de galantamina.

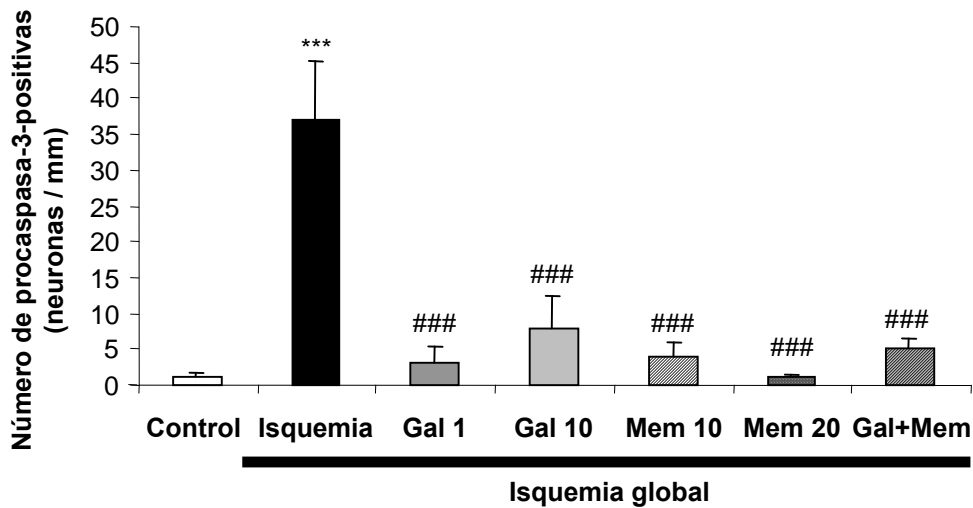
El tratamiento con memantina también redujo la expresión de procaspasa-3: con 10 mg/kg observamos  $4\pm 1.8$  neuronas/mm, y con 20 mg/kg observamos  $1\pm 0.3$  neuronas/mm. El tratamiento con la combinación de galantamina 10 mg/kg y memantina 10 mg/kg redujo la expresión hasta  $5\pm 1.5$  neuronas/mm.

En cuanto a la caspasa-3 activa (**figuras 19 y 20**), los animales del grupo control mostraron pocas neuronas positivas ( $6\pm 2.2$  neuronas/mm). La isquemia global transitoria indujo un marcado aumento de neuronas piramidales con caspasa-3 activa ( $67\pm 23.9$  neuronas/mm). El tratamiento con 1 y 10 mg/kg de galantamina redujo los niveles de caspasa-3 activa hasta  $16\pm 4.8$  neuronas/mm y  $14\pm 3.7$  neuronas/mm, respectivamente. En este caso, la mecamilamina no bloqueó el efecto de galantamina ( $19\pm 5.3$  neuronas/mm). El western blot de caspasa-3 activa mostró que sólo el grupo isquemia tuvo niveles de proteína detectables.

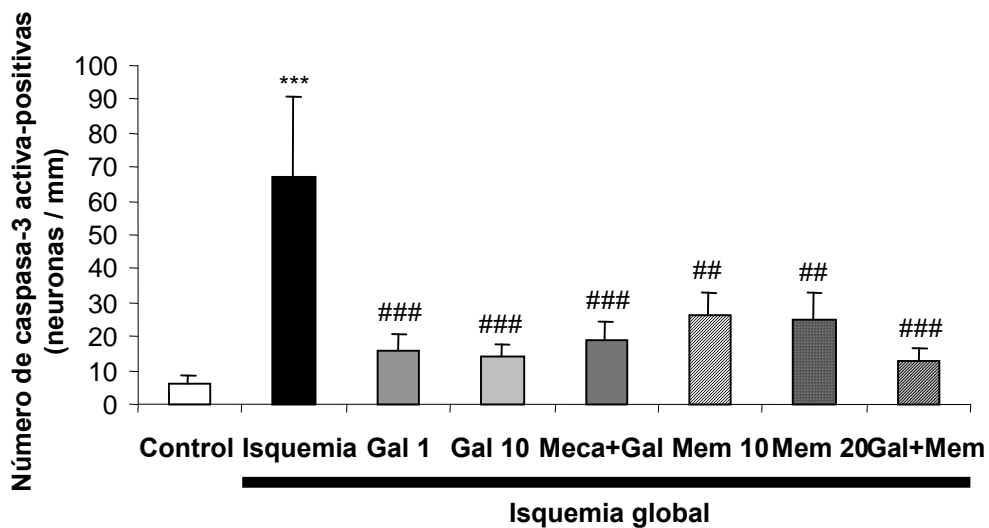
El tratamiento con memantina también redujo la expresión de caspasa-3 activa: con 10 mg/kg observamos  $26\pm 6.9$  neuronas/mm, y con 20 mg/kg observamos  $25\pm 7.7$  neuronas/mm. El tratamiento con la combinación de galantamina 10 mg/kg y memantina 10 mg/kg redujo la expresión a  $13\pm 3.4$  neuronas/mm.



**Figura 17: Galantamina, memantina y su combinación reducen la expresión de procaspasa-3 en las neuronas piramidales de CA1.** (A) Microfotografías de la inmunohistoquímica de procaspasa-3 en el estrato piramidal de CA1 de los grupos experimentales indicados en cada fotografía. Barra de calibración de 40  $\mu$ m. (B) Western blot de procaspasa-3.

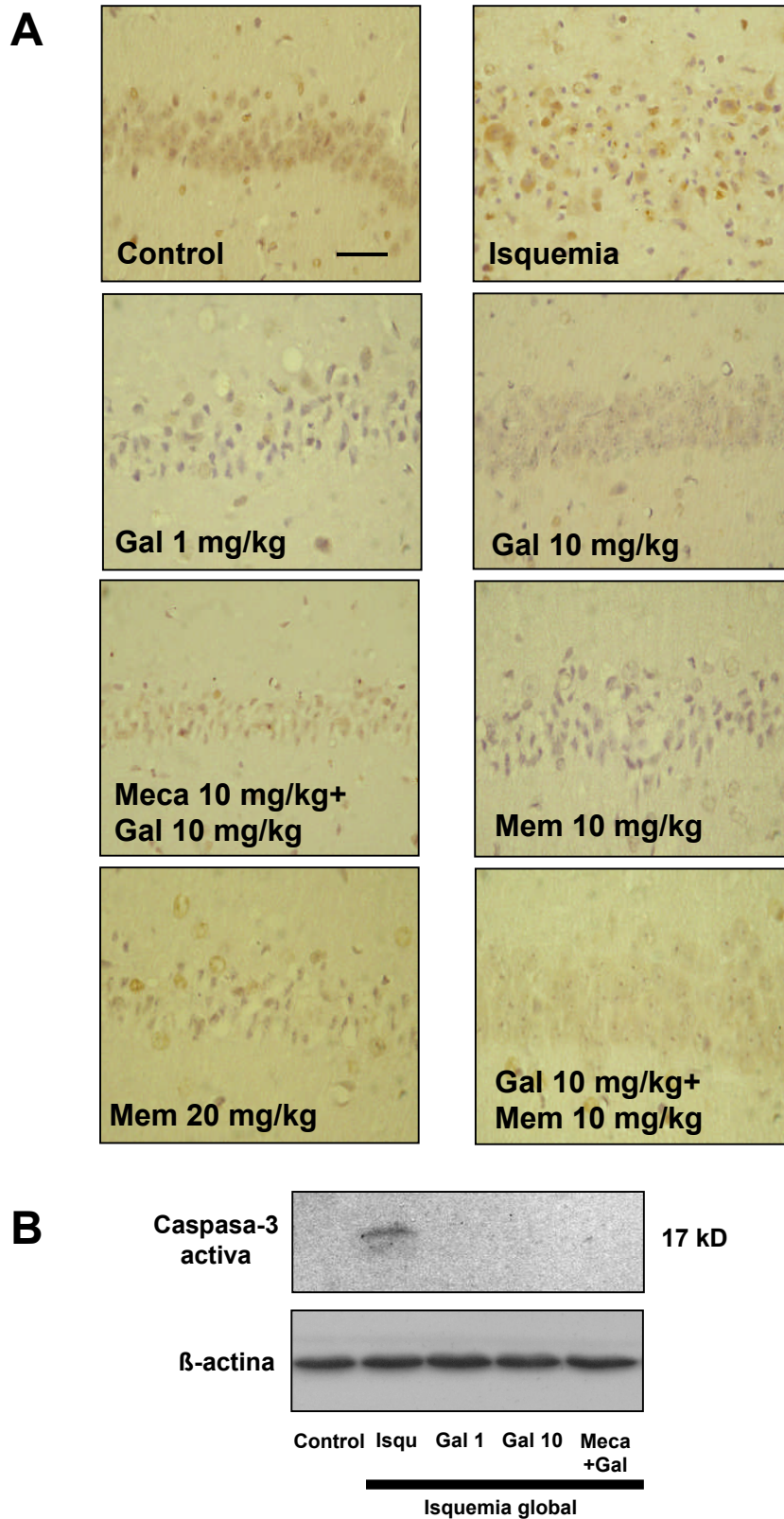


**Figura 18: Galantamina, memantina y su combinación reducen la expresión de procaspasa-3 en las neuronas piramidales de CA1.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con control; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia; ### $p < 0.001$  comparado con isquemia.



**Figura 20: Galantamina, memantina y su combinación reducen la expresión de caspasa-3 activa en las neuronas piramidales de CA1.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con control; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia; ### $p < 0.001$  comparado con isquemia.





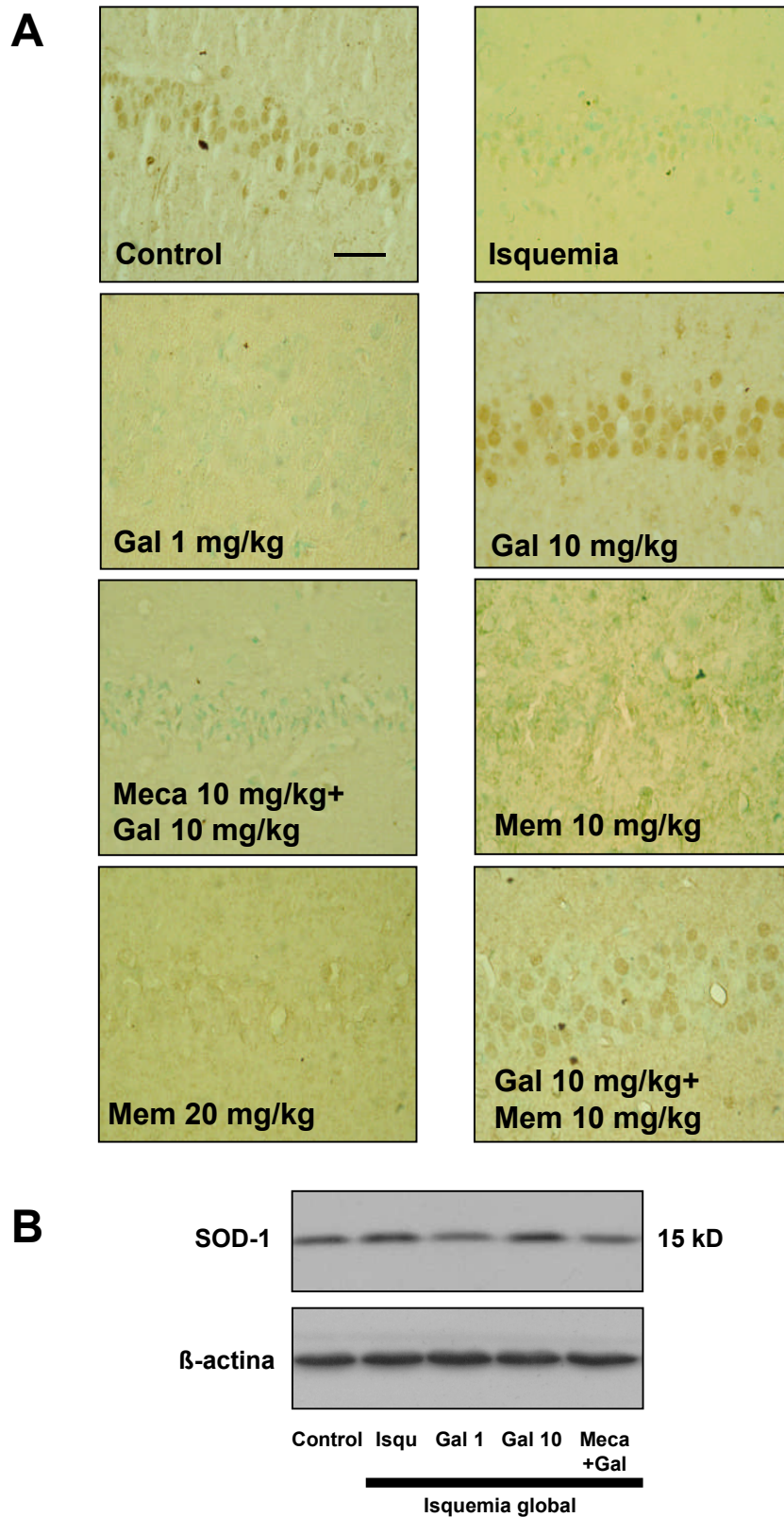
**Figura 19: Galantamina, memantina y su combinación reducen la expresión de caspasa-3 activa en las neuronas piramidales de CA1.** (A) Microfotografías de la inmunohistoquímica de caspasa-3 activa en el estrato piramidal de CA1 de los grupos experimentales indicados en cada fotografía. Barra de calibración de 40  $\mu$ m. (B) Western blot de caspasa-3 activa.

### **4.3 Los tratamientos aumentaron la expresión de SOD-1 en el hipocampo. Implicación de la activación del receptor nicotínico.**

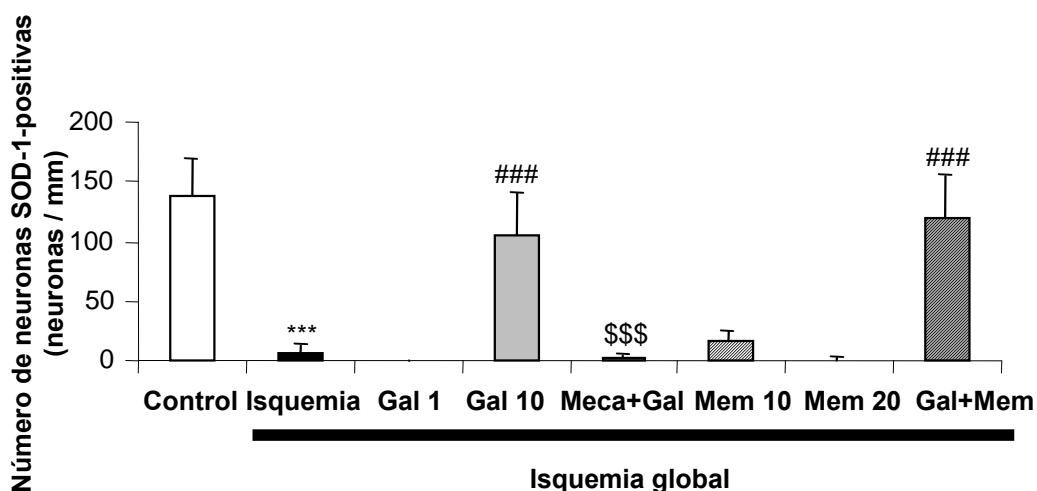
En la isquemia y, sobre todo, en la reperfusión se produce gran cantidad de radicales libres. Por ello resulta interesante analizar la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD-1.

Imágenes representativas de los principales grupos de tratamiento, así como el western blot, se muestran en la **figura 21**; los datos obtenidos se muestran en la **figura 22**. Las neuronas positivas a SOD-1 disminuyeron desde  $138 \pm 31.6$  en los animales del grupo control hasta  $7 \pm 4.9$  neuronas/mm en el grupo isquemia. A la dosis de 1 mg/kg, la galantamina no incrementó el número de neuronas positivas a SOD-1; sin embargo, a la dosis de 10mg/kg sí observamos un aumento significativo de neuronas SOD-1 positivas, concretamente  $105 \pm 34.8$  neuronas/mm. El tratamiento con mecamilamina bloqueó el efecto de galantamina ( $3 \pm 0.5$  neuronas/mm). El western blot de SOD-1 mostró unos niveles de proteína similares en el grupo isquemia y en el grupo control, que se restablecieron en el grupo tratado con galantamina 10 mg/kg. El tratamiento con mecamilamina bloqueó el efecto de galantamina.

El tratamiento con memantina no aumentó la expresión de SOD-1: con 10 mg/kg observamos  $17 \pm 8.4$  neuronas/mm, y con 20 mg/kg observamos  $1 \pm 0.7$  neuronas/mm. Sin embargo, la combinación de galantamina 10 mg/kg y memantina 10 mg/kg aumentó la expresión de SOD-1 hasta  $120 \pm 35.1$  neuronas/mm.



**Figura 21: Galantamina, memantina y su combinación aumentan la expresión de SOD-1 en las neuronas piramidales de CA1.** (A) Microfotografías de la inmunohistoquímica de SOD-1 en el estrato piramidal de CA1 de los grupos experimentales indicados en cada fotografía. Barra de calibración de 40  $\mu$ m. (B) Western blot de SOD-1.

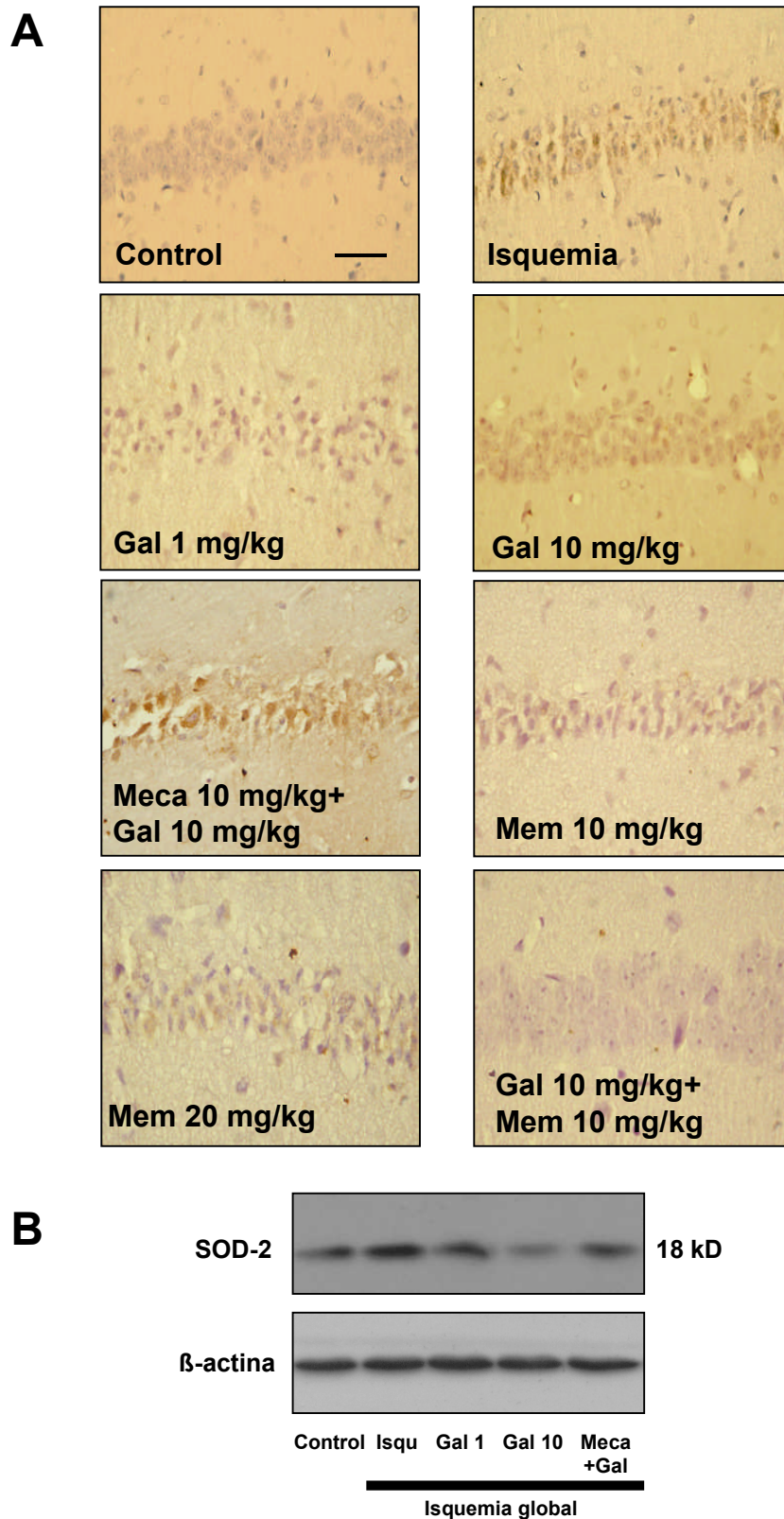


**Figura 22: Galantamina, memantina y su combinación aumentan la expresión de SOD-1 en las neuronas piramidales de CA1.** Histograma con los datos de cada grupo experimental ( $n = 8$ ) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con control; ### $p < 0.001$  comparado con isquemia; \$\$\$ $p < 0.001$  comparado con galantamina 10 mg/kg.

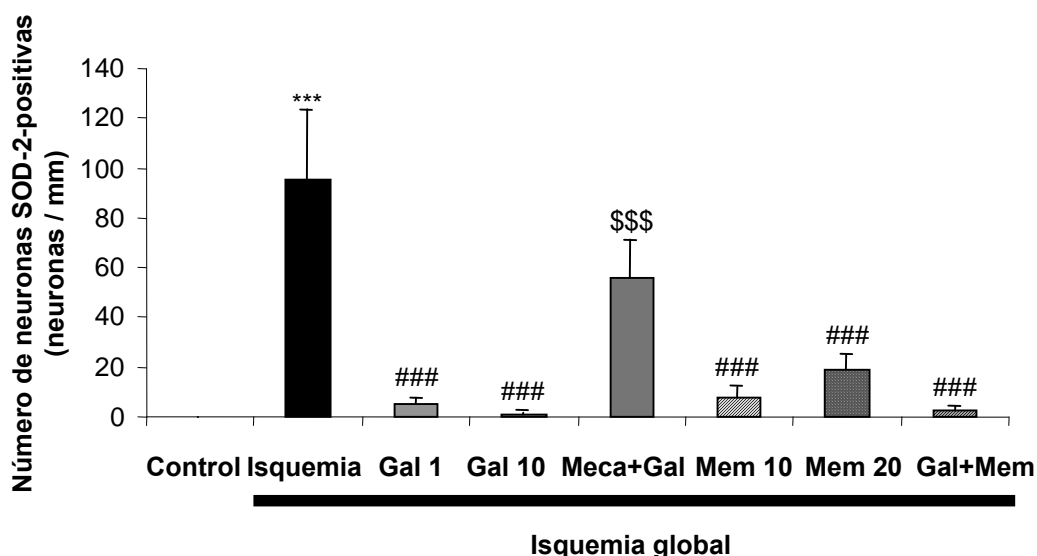
#### 4.4 Los tratamientos disminuyeron la expresión de SOD-2 en el hipocampo. Implicación de la activación del receptor nicotínico.

También analizamos la enzima inducible SOD-2 mediante inmunohistoquímica y western blot. Imágenes representativas de los principales grupos de tratamiento, así como el western blot, se muestran en la **figura 23**; los datos obtenidos se muestran en la **figura 24**. Después de la isquemia aumentaron los niveles de SOD-2 en comparación con el grupo control, llegando hasta  $95 \pm 28.6$  neuronas/mm. El tratamiento con galantamina redujo el número de neuronas positivas a  $5 \pm 2.5$  neuronas/mm a la dosis de 1 mg/kg y a  $1 \pm 0.6$  neuronas/mm a la dosis de 10 mg/kg. De nuevo, la mecamilamina bloqueó estos efectos ( $56 \pm 15.7$  neuronas/mm). En el western blot se refleja también la inducción de esta proteína por la isquemia, que se restablece en el grupo tratado con galantamina 10 mg/kg. El tratamiento con mecamilamina bloqueó el efecto de galantamina.

El tratamiento con memantina redujo de manera dosis-dependiente la expresión de SOD-2;  $7.6 \pm 3.7$  neuronas/mm a la dosis de 10 mg/kg y  $19 \pm 6.0$  neuronas/mm a la dosis de 20 mg/kg. Asimismo, la combinación de galantamina 10 mg/kg con memantina 10 mg/kg también mostró una reducción significativa del número de neuronas SOD-2 positivas ( $3 \pm 1.4$  neuronas/mm).



**Figura 23: Galantamina, memantina y su combinación reducen la expresión de SOD-2 en las neuronas piramidales de CA1.** (A) Microfotografías de la inmunohistoquímica de SOD-2 en el estrato piramidal de CA1 de los grupos experimentales indicados en cada fotografía. Barra de calibración de 40  $\mu$ m. (B) Western blot de SOD-2.

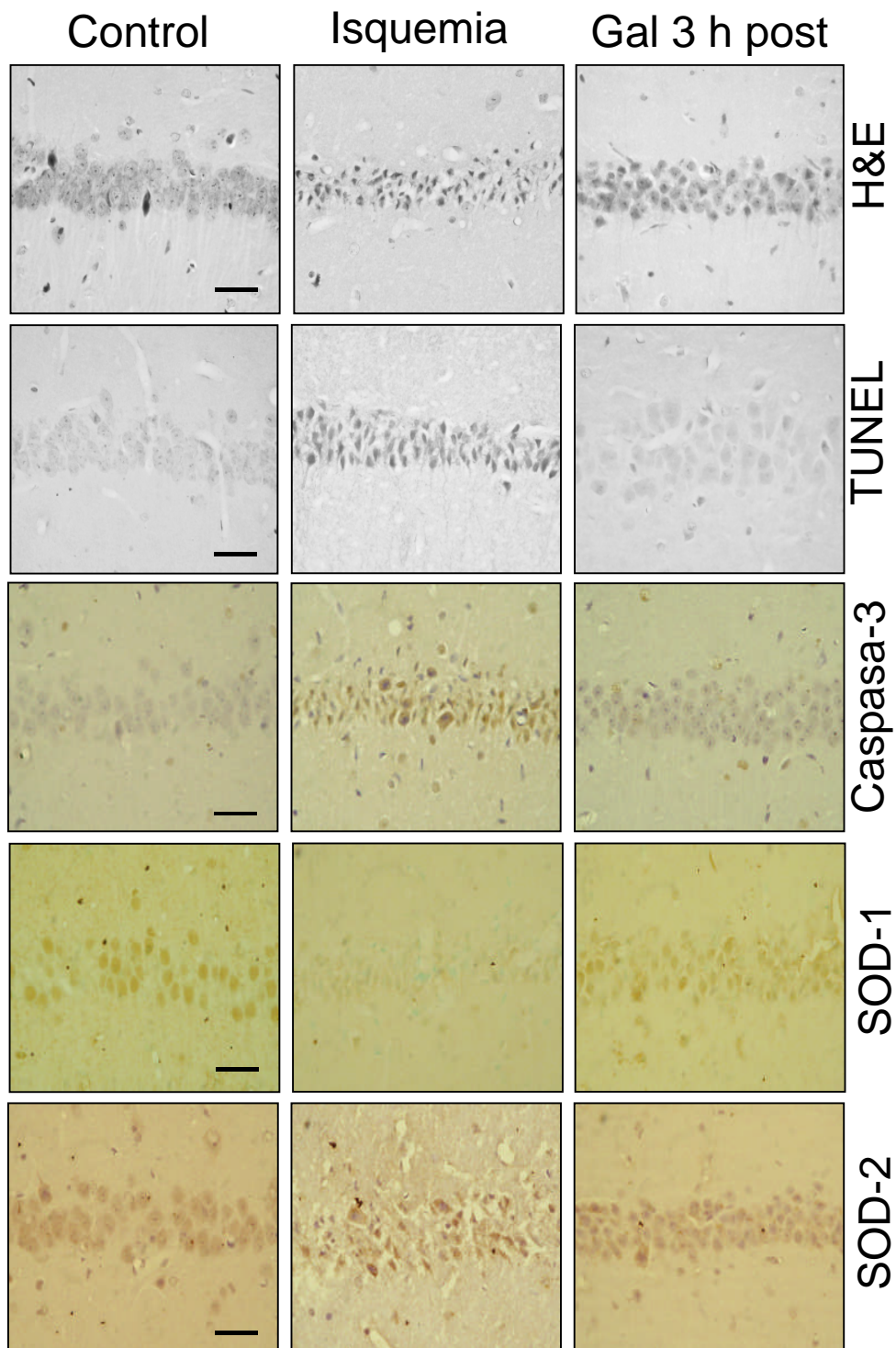


**Figura 24: Galantamina, memantina y su combinación reducen la expresión de SOD-2 en las neuronas piramidales de CA1.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con control; ### $p < 0.001$  comparado con isquemia; \$\$\$ $p < 0.001$  comparado con galantamina 10 mg/kg.

## 5. EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE GALANTAMINA SE CONSERVÓ CUANDO SE ADMINISTRÓ DESPUÉS DE LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL

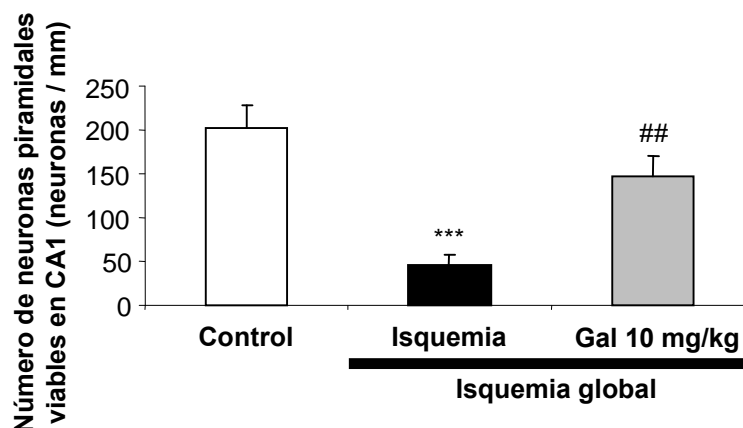
Partiendo de los resultados obtenidos con el protocolo de pre-tratamiento, diseñamos protocolos de tratamiento post-isquemia con el fármaco y la dosis neuroprotectoras. Comenzamos aumentando la ventana de tratamiento hasta 3 h.

La **figura 25** muestra las microfotografías con los parámetros analizados donde se puede observar que el efecto protector de la galantamina se mantiene incluso cuando se administra 3 h después de realizar la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes durante 5 min.



**Figura 25:** Galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia ejerce neuroprotección y reduce la fragmentación del ADN, la caspasa-3 activa y la SOD-2. Microfotografías de las tinciones en el estrato piramidal de CA1. Barras de calibración de 40  $\mu$ m.

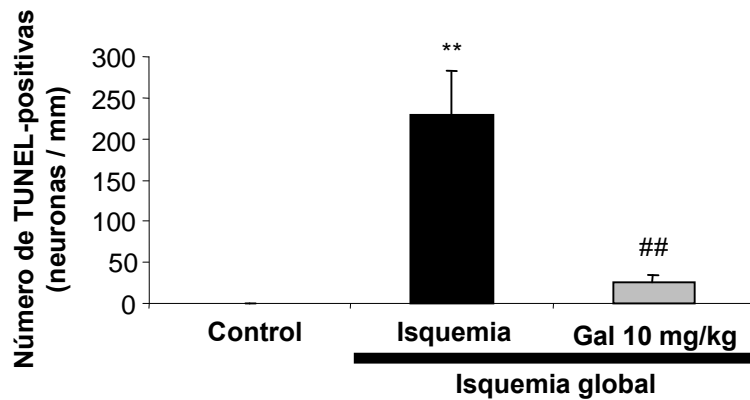
En esta batería de experimentos la isquemia redujo el número de neuronas piramidales viables/mm de  $202 \pm 26.4$  a  $46 \pm 13$ . El tratamiento con galantamina, 3 h después de la isquemia, a la dosis de 10 mg/kg aumentó este número significativamente hasta  $148 \pm 23$  neuronas/mm, un 73% del número de neuronas viables del grupo control (figura 26).



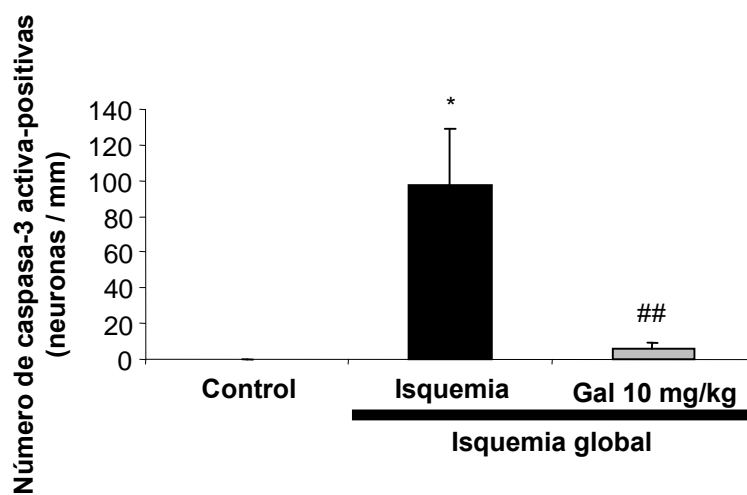
**Figura 26: Galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia ejerce neuroprotección.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\*p<0.001 comparado con control; ##p<0.01 comparado con isquemia.

El efecto neuroprotector de galantamina administrada 3 h post-isquemia se corroboró con la técnica de TUNEL y la expresión de caspasa-3 activa. No se observaron neuronas positivas a TUNEL en los animales del grupo control mientras que aparecieron  $230 \pm 53.5$  en el grupo isquemia. La galantamina redujo este número a  $25 \pm 9.4$  neuronas/mm (figura 27). No se observaron neuronas positivas a caspasa-3 en los animales del grupo control mientras que aparecieron  $98 \pm 31.1$  en el grupo isquemia. El tratamiento con la galantamina, 3 h después de la isquemia, a la dosis de 10 mg/kg redujo este número a  $6 \pm 3.3$  neuronas/mm (figura 28).



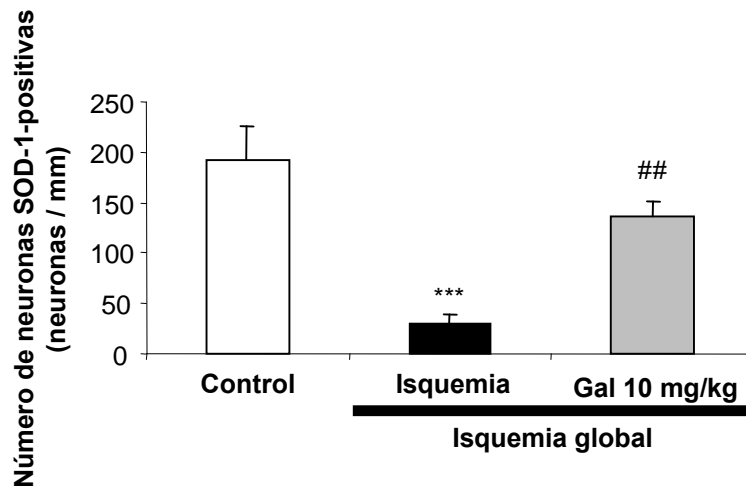


**Figura 27: Galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia reduce la fragmentación del ADN.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\* $p < 0.01$  comparado con control; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia.

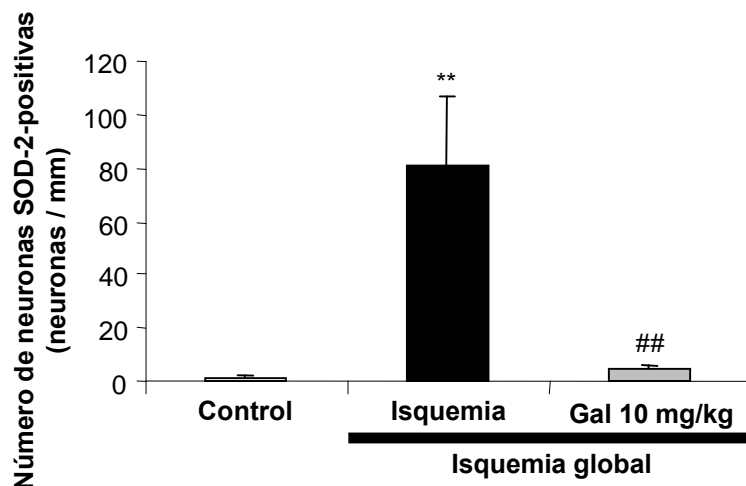


**Figura 28: Galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia reduce la caspasa-3 activa.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 8) expresados como media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$  comparado con control; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia.

Las neuronas positivas a SOD-1 disminuyeron desde  $192 \pm 33.2$  en el grupo control hasta  $30 \pm 9.4$  neuronas/mm en el grupo isquemia; el tratamiento con la galantamina, 3 h después de la isquemia, a la dosis de 10 mg/kg elevó este valor a  $136 \pm 14.4$  neuronas/mm (**figura 29**).

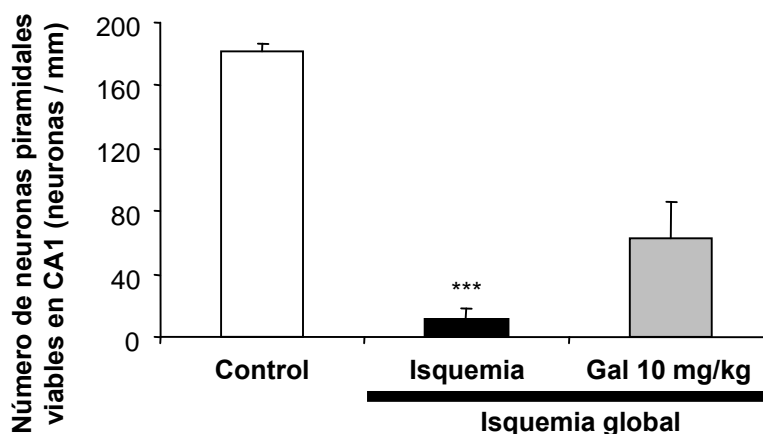


**Figura 29: Galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia aumenta la SOD-1.** Histograma con los datos de cada grupo experimental ( $n = 8$ ) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con control; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia.



**Figura 30: Galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia reduce la SOD-2.** Histograma con los datos de cada grupo experimental ( $n = 8$ ) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\* $p < 0.01$  comparado con control; ## $p < 0.01$  comparado con isquemia.

En vista de estos resultados, quisimos aumentar aún más la ventana terapéutica llegando hasta 6 h post-isquemia, pero el efecto neuroprotector ya no fue estadísticamente significativo. En los animales del grupo control observamos  $182 \pm 4.5$  neuronas/mm, mientras que en el grupo isquemia observamos  $12 \pm 6.4$  neuronas/mm y en los animales tratados con galantamina 6 h después de inducir la isquemia global, observamos  $63 \pm 23.1$  neuronas/mm (**figura 31**).



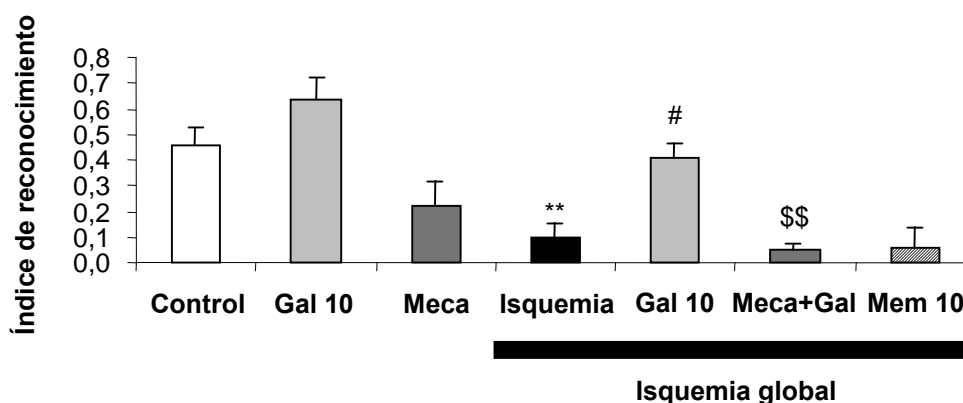
**Figura 31: Efecto sobre la neuroprotección de galantamina 10 mg/kg administrada 6 h post-isquemia.** Histograma con los datos de cada grupo experimental ( $n = 8$ ) expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con control.

## 6. EL TRATAMIENTO CON GALANTAMINA RECUPERÓ LA MEMORIA ESPACIAL: TEST DE LOCALIZACIÓN DE OBJETOS

Quisimos correlacionar los hallazgos histológicos con un test de memoria espacial para poder evaluar el funcionamiento del hipocampo. Para ello, establecimos las condiciones experimentales en las que los fármacos mostraron los efectos más relevantes: galantamina 10 mg/kg administrada 3 h post-isquemia y memantina 10 mg/kg.

Observamos una diferencia clara en la ejecución del test por parte de los animales, dependiendo del grupo experimental al que pertenecieran (**figura 32**). Los animales del grupo control diferenciaron la nueva localización de la localización familiar, mientras que los animales sometidos a isquemia no lo hicieron. Los animales tratados con galantamina 3 h después de la isquemia a la dosis de 10 mg/kg recuperaron

la capacidad de diferenciar la localización nueva de la familiar; sin embargo, esta capacidad estaba disminuida en los animales tratados con mecamilamina además de galantamina. Los animales tratados con 10 mg/kg de memantina 30 min antes de la isquemia no fueron capaces de diferenciar la localización nueva de la familiar. Realizamos un grupo control adicional tratado con galantamina sin isquemia, para observar si el fármaco tenía efecto nootrópico, y otro grupo control tratado con mecamilamina sin isquemia para descartar que la mecamilamina por sí sola redujese la memoria espacial, pero ninguno de los dos mostró diferencias estadísticamente significativa con respecto al grupo control.



**Figura 32: Recuperación de la memoria espacial después de la administración de galantamina 10 mg/kg 3 h post-isquemia.** Histograma con los datos de cada grupo experimental (n = 10) expresados como media ± error estándar. \*\*p<0.01 comparado con control; #p<0.05 comparado con isquemia; \$\$p<0.01 comparado con galantamina 10 mg/kg.

## **VI. DISCUSIÓN**

---

## 1. ANÁLISIS DEL MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO

Los modelos de isquemia global en roedores han sido ampliamente utilizados para investigar mecanismos patofisiológicos (Kirino, 1982; Pulsinelli & Brierley, 1979; Smith *et al.*, 1984), neuroprotección (Ohtsuki *et al.*, 1996; Dowden *et al.*, 1999) y conducta (Wang & Corbett, 1990; Corbett *et al.*, 1992; Colbourne *et al.*, 1998). La susceptibilidad del jerbo a la isquemia por oclusión unilateral o bilateral fue descrita por primera vez a mediados de los 60 (Levine & Payan, 1966). En este estudio se sugirió que su vulnerabilidad se debía a un polígono de Willis incompleto o funcionalmente inadecuado. Estudios anatómicos detallados en los que se estudió la circulación posterior del jerbo corroboraron la hipótesis original describiendo arteriolas pequeñas, prácticamente insignificantes ( $< 50 \mu\text{m}$ ), uniendo la circulación posterior y anterior (Harrison *et al.*, 1973; Kahn, 1972; Levine & Sohn, 1969). La existencia en los jerbos de un polígono de Willis incompleto permite obtener, mediante un procedimiento quirúrgico mucho más simple que los modelos en ratas y ratones, una isquemia global reproducible. Una oclusión bilateral de 5 min restringe los cambios histopatológicos al área CA1 del hipocampo dorsal. La consiguiente muerte neuronal no se observa hasta los 3 ó 4 días después de la isquemia; este fenómeno se conoce como muerte neuronal retardada (Kirino, 1982). En suma, el modelo de isquemia global en el jerbo ha sido ampliamente utilizado, principalmente por su relativa simplicidad quirúrgica y la reproducibilidad de la lesión que se obtiene en el área CA1 del hipocampo. Elegimos este modelo por su idoneidad para evaluar el grado de protección que ejercen los fármacos ante una lesión por isquemia en el hipocampo. Decidimos utilizar la oclusión de dos vasos en el jerbo y no la oclusión de cuatro vasos en la rata porque ésta precisa de una cirugía compleja en dos pasos quirúrgicos, la realización de un electroencefalograma y, sobre todo, porque es un modelo con una mortalidad inherente muy elevada. El modelo del jerbo es más fácil de realizar y la mortalidad es mucho menor.

Frente a estas ventajas, el modelo tiene también algunos inconvenientes como la difícil monitorización de los parámetros fisiológicos, una cierta variabilidad en la lesión que se obtiene y la propensión a las convulsiones de estos animales, que puede sesgar las escalas de evaluación neurológica. Debido a su pequeño tamaño, la monitorización de los parámetros fisiológicos es difícil en el jerbo, lo que puede invalidar un estudio de

neuroprotección ya que los cambios de estos parámetros pueden modificar la lesión cerebral tras la isquemia. Por este motivo, algunos autores han recomendado no utilizar este modelo (Traystman, 2003). El control de la temperatura, por ejemplo, es esencial, ya que la hipotermia en las primeras horas de la reperfusión es neuroprotectora (Clifton *et al.*, 1989). Por este motivo hemos utilizado sondas rectales de pequeño tamaño que nos han permitido controlar la temperatura, y hemos colocado a los animales en sus jaulas inmediatamente después de la cirugía en una incubadora a 30°C durante 4 horas, de modo que es improbable que la hipotermia esté contribuyendo a la neuroprotección. Durante la cirugía nos hemos ayudado de catéteres de diámetro muy reducido que nos han permitido canular la arteria femoral de los jerbos, pudiendo monitorizar la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la glucemia; así hemos podido excluir aquellos animales que, de lo contrario, habrían constituido una fuente de variabilidad por tener parámetros fuera de los límites normales.

Por otro lado, la variabilidad de este modelo se debe fundamentalmente a la existencia de arterias comunicantes posteriores de importancia, normalmente en un 20% de los animales (Wang *et al.*, 2002), que se atribuye a heterogeneidad genética. En nuestro caso, un 30% de los animales presentó un polígono de Willis parcial o completo. Para poder evitar el sesgo que genera esta característica hemos utilizado dos criterios de exclusión: la ausencia de ciertos signos observables durante la isquemia (respiración jadeante y movimientos corporales seguidos de quiescencia con ptosis bilateral completa y adopción de una postura encorvada) y la lesión unilateral en el hipocampo en lugar de bilateral, lo que nos ha permitido descartar al 30% de los animales, porcentaje que se corresponde con el de los jerbos con arterias comunicantes posteriores de importancia.

El tiempo de oclusión en este modelo suele ser de 5 ó 10 min. Quisimos minimizar el tiempo de oclusión, dada la gravedad de la lesión producida, y al mismo tiempo obtener resultados reproducibles; por eso elegimos una oclusión de 5 min. Asimismo, elegimos estudiar la lesión tras 72 h de reperfusión, dado que a tiempos más cortos aún no se ha producido la muerte neuronal retardada. Los tiempos más largos de supervivencia son interesantes para evaluar el efecto neuroprotector de los fármacos a largo plazo, pero no nos permiten estudiar los mecanismos neuroprotectores.

La anestesia utilizada en este estudio fue el halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoretano) al 1.5% en oxígeno a 0.75 l/min. El halotano es un anestésico general que se administra por vía inhalatoria. Los anestésicos inhalatorios dificultan el manejo del animal, sin embargo nos permiten mantener un plano de anestesia poco profundo en el momento de la isquemia y reperfusión, necesario para poder observar los signos que necesitamos verificar durante la isquemia (respiración jadeante y movimientos corporales seguidos de quiescencia con ptosis bilateral completa y adopción de una postura encorvada).

En cuanto al método de evaluación de la lesión obtenida, éste ha sido utilizado por otros autores (Asoh *et al.*, 2002; Noppens *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2002). Hay varias maneras de expresar los datos de densidad celular: número de neuronas por unidad de longitud o de área del área CA1 del estrato piramidal, como porcentaje, etc. En la literatura también se han expresado estos resultados utilizando escalas de valoración, pero este abordaje es excesivamente subjetivo. Aunque en menor medida, el método que hemos utilizado tampoco está exento de subjetividad. Para mitigarlo la evaluación se realizó de forma ciega, de manera que el observador desconocía el grupo experimental al que pertenecían las secciones histológicas.

## **2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS**

La monitorización de la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la glucemia no es una práctica habitual cuando se utiliza este modelo de isquemia, sin embargo es esencial en estudios fisiopatológicos y de neuroprotección. En este trabajo la temperatura se mantuvo constante durante todo el procedimiento quirúrgico y la presión arterial, frecuencia cardíaca y glucemia se mantuvieron dentro del rango fisiológico y sin diferencias entre los grupos, antes, durante o después de la oclusión; por lo tanto no se les puede atribuir ni la variabilidad inter-individual ni las diferencias histológicas y conductuales encontradas entre los distintos grupos experimentales.



### 3. EFECTO NEUROPROTECTOR DE GALANTAMINA, MEMANTINA Y SU COMBINACIÓN TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL CON REPERFUSIÓN EN EL JERBO

Los resultados del presente estudio muestran que la galantamina ejerció un efecto neuroprotector en un modelo de isquemia cerebral global transitoria en el jerbo. Sin embargo, la memantina no ejerció neuroprotección en este modelo. El efecto de la galantamina está relacionado con receptores nicotínicos ya que la mecamilamina, un antagonista nicotínico, bloqueó el efecto de la galantamina. La combinación de galantamina y memantina ejerció una neuroprotección mayor que cada una por separado (**figura 14**).

El perfil farmacológico de la galantamina es en realidad más complejo de lo que se pensaba. Su efecto clásico de inhibición de la acetilcolinesterasa está bien documentado, así como su acción moduladora alostérica de receptores nicotínicos (Arroyo *et al.*, 2002). En este estudio se muestra que el bloqueante del receptor nicotínico mecamilamina suprime los efectos neuroprotectores de galantamina. Por tanto, los receptores nicotínicos son necesarios para que la galantamina ejerza su efecto neuroprotector en este modelo experimental. Estos resultados confirman nuestras observaciones previas en células en cultivo de neuroblastoma humano y cromafines bovinas, en las que la galantamina protegió frente a beta-amiloide o estrés reticular; esta protección estaba ligada a receptores nicotínicos (Arias *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005).

La memantina ha ejercido neuroprotección tras la isquemia focal (Culmsee *et al.*, 2004; Gorgulu *et al.*, 2000; Seif *et al.*, 1990), sin embargo, también se ha descrito menos neuroprotección de la esperada en rodajas de hipocampo sometidas a privación de oxígeno y glucosa (Sobrado *et al.*, 2004). Una estimulación de baja intensidad de los receptores NMDA protege las células de la muerte mediada por caspasas aumentando el calcio intracelular (Snider *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 1998). De hecho, Ikonomidou y colaboradores (2000) demostraron que los antagonistas de receptores NMDA podrían promover un aumento de la muerte celular. Otra posible explicación a la ausencia de neuroprotección por memantina podría ser la existencia, en el modelo de isquemia con reperfundición, de otros mecanismos, además de la excesiva activación de los receptores

NMDA por el glutamato liberado de forma endógena. El hecho de que la galantamina ejerza mayor neuroprotección apoya esta explicación.

Debido a la multitud de mecanismos implicados en la lesión por isquemia y reperusión, es lógico emplear varios fármacos con mecanismos de acción complementarios con el objetivo de conseguir una mayor neuroprotección. En este sentido, la combinación de galantamina y memantina logra una protección prácticamente total en nuestro modelo.

#### **4. EFECTO NEUROPROTECTOR DE GALANTAMINA TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL CON REPERFUSIÓN EN EL JERBO, ADMINISTRADA POST-ISQUEMIA**

El tiempo que transcurre durante el traslado de los pacientes al hospital y el diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular, hace que sea muy difícil administrar tratamientos en las primeras horas. Por ello, un hallazgo interesante desde el punto de vista clínico y práctico de este estudio es que el efecto neuroprotector de galantamina se mantiene cuando el tratamiento se inicia 3 h después del episodio isquémico.

#### **5. MECANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR**

##### **5.1 Disminución de la fragmentación del ADN y de la caspasa-3.**

La isquemia cerebral global transitoria produce muerte celular retardada en las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo (Kirino, 1982); sin embargo, los mecanismos implicados no se conocen bien. Se ha confirmado que hay muerte celular apoptótica mediante escalera de ADN, marcaje de los extremos 3' y microscopía óptica. Sin embargo, los cambios morfológicos de la muerte neuronal retardada difieren de los de la apoptosis típica, y la microscopía electrónica ha revelado características necróticas. Los resultados descritos en este estudio muestran activación de caspasa-3 después de la isquemia, tal y como estaba descrito (Niwa *et al.*, 2001). El periodo de reperusión de 72 h puede ser demasiado largo para estudiar ciertos mecanismos de muerte o protección. Sin embargo, otros trabajos en la literatura estudian variaciones en

la caspasa-3, 72 h después de la isquemia o con periodos de reperfusión más largos (Jang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). La galantamina redujo significativamente el número de neuronas piramidales positivas a TUNEL y a procaspasa y caspasa-3 activa después de una isquemia transitoria confirmando de esta forma *in vivo* el efecto antiapoptótico descrito previamente *in vitro* (Arias *et al.*, 2004). La galantamina redujo también la activación de caspasa-3, independientemente de los receptores nicotínicos. Sin embargo, en la reducción de la fragmentación del ADN sí estuvieron involucrados, al menos en parte, los receptores nicotínicos (ver figuras 16 y 20). Este hecho implica que otros mecanismos, independientes de caspasa-3, también están participando en el efecto neuroprotector de la galantamina. Estos mecanismos de muerte celular, independiente de caspasas, se han descrito también en este modelo por otros autores (Colbourne *et al.*, 1998; Nitatori *et al.*, 1995).

La memantina y su combinación con galantamina también redujeron la fragmentación del ADN y los niveles de caspasa-3 de manera significativa. Es curioso que, a pesar de estos resultados positivos, la memantina no aumente la viabilidad de las neuronas piramidales de CA1. Esto evidencia que, aunque la memantina pueda proteger de la muerte apoptótica o de la muerte celular con fragmentación del ADN, finalmente las neuronas acaban muriendo por otras vías.

## 5.2 Normalización de la expresión de las enzimas SOD-1 y SOD-2.

Está bien documentado que la reperfusión después de la isquemia cerebral conlleva un aumento excesivo de la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden exacerbar la muerte celular después del episodio isquémico (McCord, 1985). De esta manera, la actividad de las enzimas antioxidantes en el tejido afectado por la isquemia-reperfusión es particularmente importante, dado que es la primera defensa endógena frente al daño inducido por radicales libres. La defensa enzimática frente a especies activadas de oxígeno implica la acción cooperativa de diferentes enzimas antioxidantes; este estudio se ha centrado en la SOD-1 (superóxido dismutasa Cu/Zn citosólica), que es constitutiva y la SOD-2 (superóxido dismutasa Mn mitocondrial), que es inducible. Otros trabajos en la literatura describen cambios en la SOD-1 y SOD-2 después de la isquemia con 72 h de reperfusión. Kumagai y colaboradores (2004) realizaron una escala temporal y concluyeron que la isquemia reducía los niveles de

SOD-1 entre los días 1 y 14 de reperfusión, hallando el nivel mínimo el día 5; y los niveles de SOD-2 están aumentados por la isquemia ya a los 5 días de la reperfusión.

Hemos confirmado que la inmunoreactividad a SOD-1 disminuye después de la isquemia-reperfusión tal y como ya se había descrito en este modelo animal Kumagai y colaboradores (2004). Esta disminución podría estar causada por la gran cantidad de radicales superóxido generados durante la isquemia y al principio de la reperfusión (Sakamoto *et al.*, 1991). El tratamiento con galantamina, tanto previo como 3 h después del episodio isquémico, hizo que aumentase el número de neuronas del estrato piramidal positivas a SOD-1. La galantamina, mediante el aumento de SOD-1, podría jugar un papel importante en la prevención de los efectos dañinos de los radicales superóxido y de su consiguiente muerte neuronal retardada. El aumento de los niveles de SOD-1 se relacionó con los receptores nicotínicos, ya que el tratamiento con mecamilamina redujo el número de neuronas SOD-1 inmunorreactivas en los animales tratados con galantamina. Hay una discrepancia entre los resultados de inmunohistoquímica y los de western blot, ya que en el western el nivel de SOD-1 en el grupo isquemia se mantuvo elevado. Esto podría achacarse a que para realizar el western se toma el hipocampo completo y son considerados otros estratos distintos del piramidal, así como otras áreas distintas de CA1 (CA3 y el giro dentado son inmunorreactivas a SOD-1 después de la isquemia).

Con la SOD-2 se observó el patrón opuesto, ya que el número de neuronas inmunorreactivas aumentó significativamente en animales sometidos a isquemia-reperfusión; estos resultados están en línea con los anteriormente descritos en este modelo (Garnier *et al.*, 2001). En nuestros experimentos, los animales tratados con galantamina, antes o después de la isquemia-reperfusión, mostraron reducción de las neuronas positivas a SOD-2 y este efecto fue bloqueado por mecamilamina. La galantamina, por tanto, podría estar protegiendo de la muerte celular causada por los radicales de oxígeno generados durante el periodo de reperfusión.

El bloqueo por mecamilamina de los efectos de galantamina sobre la SOD-1 y SOD-2 sugieren que los efectos de la galantamina mediados por receptores nicotínicos podrían jugar un papel importante en la prevención de los efectos dañinos de los radicales superóxido. De hecho, Li y colaboradores (2000) describieron que la

activación de los receptores alfa-7 por el compuesto GTS-21 atenuó el estrés oxidativo intracelular producido por etanol; de la misma manera, Ravikumar y colaboradores (2004) describieron, en ratas con lesión de la médula espinal, que la nicotina puede proteger de la activación de los factores de transcripción de respuesta a oxidorreducción NF- $\kappa$ B, AP-1 y CREB, reduciendo así los niveles de ARN mensajero de TNF $\alpha$  y MCP-1, efecto que fue revertido por mecamilamina.

Sin embargo, la memantina no restituyó los niveles de SOD-1, mostrando una inmunorreactividad disminuida similar a la del grupo isquemia, probablemente porque la gran cantidad de radicales superóxido generada ha hecho que se reduzcan los niveles de la enzima. Los animales tratados con galantamina y con la combinación, sin embargo, tienen niveles altos de SOD-1. Esto podría deberse a que los radicales libres generados están siendo procesados por otros mecanismos distintos de SOD-1, como otras enzimas y moléculas antioxidantes o incluso por la misma galantamina, ya que es una molécula con propiedades antioxidantes (Traykova *et al.*, 2003).

La memantina sí restituyó los niveles de SOD-2, al igual que la galantamina y su combinación. Una posible explicación podría ser que esta enzima no se ha inducido, en el caso de galantamina y la combinación debido de nuevo a que la sobreproducción de radicales libres ya esté bajo control mediante otros mecanismos de defensa, y en el caso de la memantina porque su acción sobre el receptor NMDA esté impidiendo de alguna manera la inducción de SOD-2, dejando a la célula indefensa.

## **6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GALANTAMINA Y MEMANTINA SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL CON REPERFUSIÓN EN EL JERBO**

El hecho de que la neuroprotección ejercida por la galantamina se traduzca en la recuperación de la memoria espacial y, por lo tanto, en la recuperación de las funciones del hipocampo, refuerza la importancia de los hallazgos histopatológicos observados en los animales tratados con galantamina; y está en concordancia con la literatura previa en roedores (de Bruin & Pouzet, 2006; Iliev *et al.*, 2000b; Ji *et al.*, 2007; Van Dam & De Deyn, 2006) y humanos (Erkinjuntti *et al.*, 2003; Wilcock *et al.*, 2000).

Los hallazgos de este estudio aportan evidencia de la prevención por galantamina y su combinación con memantina de la muerte neuronal, así como de la recuperación de la memoria espacial tras la isquemia cerebral global transitoria y el tratamiento con galantamina, lo que podría beneficiar a los pacientes con enfermedad cerebrovascular.

## **VII. CONCLUSIONES**

---

**CONCLUSIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL**

De los resultados que presentamos en esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La galantamina, pero no la memantina, ejerce neuroprotección al aumentar la viabilidad de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, en un modelo de isquemia cerebral global con reperfusión en el jerbo. Es interesante destacar que la combinación de galantamina y memantina ejerce un efecto neuroprotector mayor que cada uno de los fármacos por separado.
2. La galantamina, administrada post-isquemia, ejerce neuroprotección al aumentar la viabilidad de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, en un modelo de isquemia cerebral global con reperfusión en el jerbo.
3. El efecto neuroprotector de la galantamina y de su combinación con la memantina está relacionado con la reducción de los fenómenos apoptóticos y la normalización de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa-1 y 2.
4. El tratamiento post-isquemia con galantamina hace que se recupere la memoria espacial perdida tras la isquemia cerebral global con reperfusión en el jerbo.
5. Parte del efecto neuroprotector de la galantamina está relacionado con los receptores nicotínicos.



## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

---

Andine, P., Orwar, O., Jacobson, I., Sandberg, M., & Hagberg, H. (1991). Changes in extracellular amino acids and spontaneous neuronal activity during ischemia and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus. *J.Neurochem.* **57**, 222-229.

Arias, E., Ales, E., Gabilan, N. H., Cano-Abad, M. F., Villarroya, M., Garcia, A. G., & Lopez, M. G. (2004). Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **46**, 103-114.

Arias, E., Gallego-Sandin, S., Villarroya, M., Garcia, A. G., & Lopez, M. G. (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **315**, 1346-1353.

Arroyo, G., Aldea, M., Fuentealba, J., & Garcia, A. G. (2002). [Nicotinic Receptor, galantamine and Alzheimer disease]. *Rev.Neurol.* **34**, 1057-1065.

Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamagata, K., & Ohta, S. (2002). Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 17107-17112.

Backhauss, C. & Krieglstein, J. (1992). Extract of kava (*Piper methysticum*) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents. *Eur.J.Pharmacol.* **215**, 265-269.

Barnes, C. A., Meltzer, J., Houston, F., Orr, G., McGann, K., & Wenk, G. L. (2000). Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience* **99**, 17-23.

Bear, M. F., Kleinschmidt, A., Gu, Q. A., & Singer, W. (1990). Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *J.Neurosci.* **10**, 909-925.

Bernardi, P., Broekemeier, K. M., & Pfeiffer, D. R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J.Bioenerg.Biomembr.* **26**, 509-517.

Blalock, E. M., Chen, K. C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., & Landfield, P. W. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J.Neurosci.* **23**, 3807-3819.

Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.

Block, F. & Schwarz, M. (1996). Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci.Lett.* **208**, 41-44.

Bores, G. M., Huger, F. P., Petko, W., Mutlib, A. E., Camacho, F., Rush, D. K., Selk, D. E., Wolf, V., Kosley, R. W., Jr., Davis, L., & Vargas, H. M. (1996). Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **277**, 728-738.

Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A., & Attwell, D. (1992). The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**, 471-474.

Bullock, R., Erkinjuntti, T., & Lilienfeld, S. (2004). Management of patients with Alzheimer's disease plus cerebrovascular disease: 12-month treatment with galantamine. *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* **17**, 29-34.

Capsoni, S., Giannotta, S., & Cattaneo, A. (2002). Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 12432-12437.

Castillo, M. J., Scheen, A. J., & Lefebvre, P. J. (1995). Amylin/islet amyloid polypeptide: biochemistry, physiology, patho-physiology. *Diabete Metab* **21**, 3-25.

Chen, H. S., Wang, Y. F., Rayudu, P. V., Edgecomb, P., Neill, J. C., Segal, M. M., Lipton, S. A., & Jensen, F. E. (1998). Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* **86**, 1121-1132.

Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., & Balentine, J. D. (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* **17**, 738-743.

Choi, D. W. & Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu.Rev.Neurosci.* **13**, 171-182.

Chopin, P. & Briley, M. (1992). Effects of four non-cholinergic cognitive enhancers in comparison with tacrine and galanthamine on scopolamine-induced amnesia in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **106**, 26-30.

Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E., & Westbrook, G. L. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* **258**, 1498-1501.

Clifton, G. L., Taft, W. C., Blair, R. E., Choi, S. C., & DeLorenzo, R. J. (1989). Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke* **20**, 1545-1552.

Colbourne, F., Auer, R. N., & Sutherland, G. R. (1998). Characterization of postischemic behavioral deficits in gerbils with and without hypothermic neuroprotection. *Brain Res.* **803**, 69-78.

Corbett, D., Evans, S. J., & Nurse, S. M. (1992). Impaired acquisition of the Morris water maze following global ischemic damage in the gerbil. *Neuroreport* **3**, 204-206.

Coyle, J. T. & Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.

Culmsee, C., Junker, V., Kremers, W., Thal, S., Plesnila, N., & Kriegstein, J. (2004). Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke* **35**, 1197-1202.

de Bruin, N. & Pouzet, B. (2006). Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **85**, 253-260.

Dogan, A., Eras, M. A., Rao, V. L., & Dempsey, R. J. (1999). Protective effects of memantine against ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Acta Neurochir.(Wien.)* **141**, 1107-1113.

Dowden, J., Reid, C., Dooley, P., & Corbett, D. (1999). Diazepam-induced neuroprotection: dissociating the effects of hypothermia following global ischemia. *Brain Res.* **829**, 1-6.

Duszczyk, M., Gadamski, R., Ziembowicz, A., Danysz, W., & Lazarewicz, J. W. (2005). NMDA receptor antagonism does not inhibit induction of ischemic tolerance in gerbil brain in vivo. *Neurotox.Res.* **7**, 283-292.

Eklof, B. & Siesjö, B. K. (1972). The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand.* **86**, 155-165.

Ennaceur, A., Neave, N., & Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the

medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp.Brain Res.* **113**, 509-519.

Erkinjuntti, T., Kurz, A., Small, G. W., Bullock, R., Lilienfeld, S., & Damaraju, C. V. (2003). An open-label extension trial of galantamine in patients with probable vascular dementia and mixed dementia. *Clin.Ther.* **25**, 1765-1782.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.* **148**, 2207-2216.

Fishkin, R. J., Ince, E. S., Carlezon, W. A., Jr., & Dunn, R. W. (1993). D-cycloserine attenuates scopolamine-induced learning and memory deficits in rats. *Behav.Neural Biol.* **59**, 150-157.

Frankiewicz, T., Pilc, A., & Parsons, C. G. (2000). Differential effects of NMDA-receptor antagonists on long-term potentiation and hypoxic/hypoglycaemic excitotoxicity in hippocampal slices. *Neuropharmacology* **39**, 631-642.

Garcia, d. A., Wegner, F., Gruner, K., Verdaguer, E., Pallas, M., Camins, A., Wagner, A., Wohlfahrt, K., & Allgaier, C. (2006). Different capacities of various NMDA receptor antagonists to prevent ischemia-induced neurodegeneration in human cultured NT2 neurons. *Neurochem.Int.* **49**, 466-474.

Garnier, Y., Pfeiffer, D., Jensen, A., & Berger, R. (2001). Effects of mild hypothermia on metabolic disturbances in fetal hippocampal slices after oxygen/glucose deprivation depend on depth and time delay of cooling. *J.Soc.Gynecol.Investig.* **8**, 198-205.

Giacobini, E. (1990). Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer disease. *J.Neurosci.Res.* **27**, 548-560.

Ginsberg, M. D. & Busto, R. (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* **20**, 1627-1642.

Gorgulu, A., Kins, T., Cobanoglu, S., Unal, F., Izgi, N. I., Yanik, B., & Kucuk, M. (2000). Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir.(Wien.)* **142**, 1287-1292.

Gould, T. J. & Feiro, O. R. (2005). Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamine treatment. *Behav.Brain Res.* **165**, 160-171.

Greenamyre, J. T., Maragos, W. F., Albin, R. L., Penney, J. B., & Young, A. B. (1988). Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **12**, 421-430.

Harrison, M. J., Brownbill, D., Lewis, P. D., & Russell, R. W. (1973). Cerebral edema following carotid artery ligation in the gerbil. *Arch.Neurol.* **28**, 389-391.

Ikonomidou, C., Stefovskaja, V., & Turski, L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12885-12890.

Iliev, A. I., Traykov, V. B., Mantchev, G. T., Stoykov, I., Prodanov, D., Yakimova, K. S., & Krushkov, I. M. (2000b). A post-ischaemic single administration of galanthamine, a cholinesterase inhibitor, improves learning ability in rats. *J.Pharm.Pharmacol.* **52**, 1151-1156.

Iliev, A. I., Traykov, V. B., Mantchev, G. T., Stoykov, I., Prodanov, D., Yakimova, K. S., & Krushkov, I. M. (2000a). A post-ischaemic single administration of galanthamine, a cholinesterase inhibitor, improves learning ability in rats. *J.Pharm.Pharmacol.* **52**, 1151-1156.

Jang, M. H., Shin, M. C., Lee, T. H., Lim, B. V., Shin, M. S., Min, B. I., Kim, H., Cho, S., Kim, E. H., & Kim, C. J. (2003). Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region in gerbils. *Neurosci.Lett.* **347**, 5-8.

Ji, X., Li, C., Lu, Y., Chen, Y., & Guo, L. (2007). Post-ischemic continuous administration of galantamine attenuates cognitive deficits and hippocampal neurons loss after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci.Lett.* **416**, 92-95.

Kahn, K. (1972). The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* **22**, 510-515.

Karanian, D. A., Baude, A. S., Brown, Q. B., Parsons, C. G., & Bahr, B. A. (2006). 3-Nitropropionic acid toxicity in hippocampus: protection through N-methyl-D-aspartate receptor antagonism. *Hippocampus* **16**, 834-842.

Kertesz, A. (2002). Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomized trial. *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.* **2**, 503-504.

Kihara, T., Sawada, H., Nakamizo, T., Kanki, R., Yamashita, H., Maelicke, A., & Shimohama, S. (2004). Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks Abeta-enhanced glutamate toxicity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **325**, 976-982.

Kirino, T. (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57-69.

Kudo, M., Aoyama, A., Ichimori, S., & Fukunaga, N. (1982). An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* **13**, 505-508.

Kumagai, R., Oki, C., Muramatsu, Y., Kurosaki, R., Kato, H., & Araki, T. (2004). Pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, reduces hippocampal damage after transient cerebral ischemia in gerbils. *J.Neural Transm.* **111**, 1103-1120.

Lapchak, P. A. (2006). Memantine, an uncompetitive low affinity NMDA open-channel antagonist improves clinical rating scores in a multiple infarct embolic stroke model in rabbits. *Brain Res.* **1088**, 141-147.

Levine, S. & Payan, H. (1966). Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp.Neurol.* **16**, 255-262.

Levine, S. & Sohn, D. (1969). Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch.Pathol.* **87**, 315-317.

Li, Y., King, M. A., & Meyer, E. M. (2000). alpha7 nicotinic receptor-mediated protection against ethanol-induced oxidative stress and cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res.* **861**, 165-167.

Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., Altar, C. A., & DiStefano, P. S. (1994). Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* **17**, 182-190.

Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L., & Hsu, C. Y. (1989). Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am.J.Physiol* **256**, H589-H593.

Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84-91.

Loskota, Lomax, & Verity (1974). *A stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain (Meriones unguiculatus)*, 1 ed. ann arbor science publishers inc, Michigan.

Martinez, S. G., Candelario-Jalil, E., Giuliani, A., Leon, O. S., Sam, S., Delgado, R., & Nunez Selles, A. J. (2001). "Mangifera indica L. extract (QF808) reduces ischaemia-induced neuronal loss and oxidative damage in the gerbil brain". *Free Radic.Res.* **35**, 465-473.

- Mayer, M. L. & Westbrook, G. L. (1984). Mixed-agonist action of excitatory amino acids on mouse spinal cord neurones under voltage clamp. *J.Physiol* **354**, 29-53.
- McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N.Engl.J.Med.* **312**, 159-163.
- Medrano Albero, M. J., Boix Martínez, R., Cerrato Crespán, E., & Ramírez Santa-Pau, M. (2006). INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE CARDIOPATÍA ISQUÉMICA Y ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR EN ESPAÑA: REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA. *Revista Española de Salud Pública* 5-15.
- Miguel-Hidalgo, J. J., Alvarez, X. A., Cacabelos, R., & Quack, G. (2002). Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res.* **958**, 210-221.
- Moriguchi, S., Marszalec, W., Zhao, X., Yeh, J. Z., & Narahashi, T. (2004). Mechanism of action of galantamine on N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical neurons. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **310**, 933-942.
- Nitatori, T., Sato, N., Waguri, S., Karasawa, Y., Araki, H., Shibana, K., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (1995). Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J.Neurosci.* **15**, 1001-1011.
- Niwa, M., Hara, A., Iwai, T., Wang, S., Hotta, K., Mori, H., & Uematsu, T. (2001). Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci.Lett.* **300**, 103-106.
- Noppens, R. R., Christ, M., Brambrink, A. M., Koerner, I. P., Heimann, A., & Kempster, O. (2006). An early bolus of hypertonic saline hydroxyethyl starch improves long-term outcome after global cerebral ischemia. *Crit Care Med.* **34**, 2194-2200.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465.
- Ohtsuki, T., Matsumoto, M., Taguchi, A., Yang, G. M., Mabuchi, T., Matsushita, K., Kuwabara, K., Kitagawa, K., & Yanagihara, T. (1996). Bifemelane hydrochloride enhances 'ischemic tolerance' phenomenon in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Life Sci.* **59**, 979-985.



Orgogozo, J. M., Rigaud, A. S., Stoffler, A., Mobius, H. J., & Forette, F. (2002). Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke* **33**, 1834-1839.

Overgaard, K., Sereghy, T., Boysen, G., Pedersen, H., Hoyer, S., & Diemer, N. H. (1992). A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **12**, 484-490.

Palmer, A. M. & Gershon, S. (1990). Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J.* **4**, 2745-2752.

Parsons, C. G., Danysz, W., & Quack, G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology* **38**, 735-767.

Pulsinelli, W. A. & Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**, 267-272.

Rao, V. L., Dogan, A., Todd, K. G., Bowen, K. K., & Dempsey, R. J. (2001). Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* **911**, 96-100.

Ravikumar, R., Flora, G., Geddes, J. W., Hennig, B., & Toborek, M. (2004). Nicotine attenuates oxidative stress, activation of redox-regulated transcription factors and induction of proinflammatory genes in compressive spinal cord trauma. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **124**, 188-198.

Sakamoto, A., Ohnishi, S. T., Ohnishi, T., & Ogawa, R. (1991). Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res.* **554**, 186-192.

Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-446.

Santos, M. D., Alkondon, M., Pereira, E. F., Aracava, Y., Eisenberg, H. M., Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (2002). The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol.Pharmacol.* **61**, 1222-1234.

Schilstrom, B., Ivanov, V. B., Wiker, C., & Svensson, T. H. (2007). Galantamine enhances dopaminergic neurotransmission in vivo via allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacology* **32**, 43-53.

Schrattenholz, A., Pereira, E. F., Roth, U., Weber, K. H., Albuquerque, E. X., & Maelicke, A. (1996). Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol.Pharmacol.* **49**, 1-6.

Seif, e. N., Peruche, B., Rossberg, C., Mennel, H. D., & Krieglstein, J. (1990). Neuroprotective effect of memantine demonstrated in vivo and in vitro. *Eur.J.Pharmacol.* **185**, 19-24.

Siesjo, B. K. (1994). Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **747**, 140-161.

Sinn, D. I., Lee, S. T., Chu, K., Jung, K. H., Song, E. C., Kim, J. M., Park, D. K., Kim, M., & Roh, J. K. (2007). Combined neuroprotective effects of celecoxib and memantine in experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosci.Lett.* **411**, 238-242.

Smith, M. L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosen, I., Wieloch, T., & Siesjo, B. K. (1984). Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol.Scand.* **69**, 385-401.

Snider, B. J., Tee, L. Y., Canzoniero, L. M., Babcock, D. J., & Choi, D. W. (2002). NMDA antagonists exacerbate neuronal death caused by proteasome inhibition in cultured cortical and striatal neurons. *Eur.J.Neurosci.* **15**, 419-428.

Sobrado, M., Roda, J. M., Lopez, M. G., Egea, J., & Garcia, A. G. (2004). Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci.Lett.* **365**, 132-136.

Stieg, P. E., Sathi, S., Warach, S., Le, D. A., & Lipton, S. A. (1999). Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur.J.Pharmacol.* **375**, 115-120.

Summers, K. L. & Giacobini, E. (1995). Effects of local and repeated systemic administration of (-)nicotine on extracellular levels of acetylcholine, norepinephrine, dopamine, and serotonin in rat cortex. *Neurochem.Res.* **20**, 753-759.

Sweeney, J. E., Hohmann, C. F., Moran, T. H., & Coyle, J. T. (1988). A long-acting cholinesterase inhibitor reverses spatial memory deficits in mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **31**, 141-147.

Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., & Teasdale, G. M. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological

consequences following middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **1**, 53-60.

Tanaka, H., Calderone, A., Jover, T., Grooms, S. Y., Yokota, H., Zukin, R. S., & Bennett, M. V. (2002). Ischemic preconditioning acts upstream of GluR2 down-regulation to afford neuroprotection in the hippocampal CA1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 2362-2367.

Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.

Traykova, M., Traykov, T., Hadjimitova, V., Krikorian, K., & Bojadgieva, N. (2003). Antioxidant properties of galantamine hydrobromide. *Z.Naturforsch.[C.]* **58**, 361-365.

Traystman, R. J. (2003). Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR.J.* **44**, 85-95.

Van Dam, D. & De Deyn, P. P. (2006). Cognitive evaluation of disease-modifying efficacy of galantamine and memantine in the APP23 model. *Eur.Neuropsychopharmacol.* **16**, 59-69.

Wang, D. & Corbett, D. (1990). Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Res.* **533**, 78-82.

Wang, Q., Sun, A. Y., Simonyi, A., Jensen, M. D., Shelat, P. B., Rottinghaus, G. E., MacDonald, R. S., Miller, D. K., Lubahn, D. E., Weisman, G. A., & Sun, G. Y. (2005). Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J.Neurosci.Res.* **82**, 138-148.

Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G. E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G. Y., & Sun, A. Y. (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.* **958**, 439-447.

Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S., & Ginsberg, M. D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann.Neurol.* **17**, 497-504.

Weible, A. P., Oh, M. M., Lee, G., & Disterhoft, J. F. (2004). Galantamine facilitates acquisition of hippocampus-dependent trace eyeblink conditioning in aged rabbits. *Learn.Mem.* **11**, 108-115.

Wenk, G. L., Zajaczkowski, W., & Danysz, W. (1997). Neuroprotection of acetylcholinergic basal forebrain neurons by memantine and neurokinin B. *Behav. Brain Res.* **83**, 129-133.

Wilcock, G., Mobius, H. J., & Stoffler, A. (2002). A double-blind, placebo-controlled multicentre study of memantine in mild to moderate vascular dementia (MMM500). *Int. Clin. Psychopharmacol.* **17**, 297-305.

Wilcock, G. K., Lilienfeld, S., & Gaens, E. (2000). Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. Galantamine International-1 Study Group. *BMJ* **321**, 1445-1449.

Willard, L. B., Hauss-Wegrzyniak, B., Danysz, W., & Wenk, G. L. (2000). The cytotoxicity of chronic neuroinflammation upon basal forebrain cholinergic neurons of rats can be attenuated by glutamatergic antagonism or cyclooxygenase-2 inhibition. *Exp. Brain Res.* **134**, 58-65.

Winblad, B. & Poritis, N. (1999). Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **14**, 135-146.

Woodruff-Pak, D. S., Vogel, R. W., III, & Wenk, G. L. (2001). Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 2089-2094.

Yano, S., Tokumitsu, H., & Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* **396**, 584-587.

## **IX. ANEXO**

---

López, MG. Arias, E. Sobrado, M. Lorrio, S. Roda, JM. García, AG. (2006). Can Cholinesterase inhibitors provide additional effects to cholinergic neurotransmission enhancement? *J.Mol.Neurosci* **30**, 141-144.

Lorrio, S. Sobrado, M. Arias, E. Roda, JM. García, AG. López, MG. (2007). Galantamine post-ischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* en proceso de revisión.

