

TITULO DE LA TESIS

**“Rol de venlafaxina e hiperforina en la recuperación funcional y plasticidad neuronal inducida por isquemia focal en corteza motora de rata.”**

Tesis entregada a



LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

En cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia

Facultad De Ciencias

Por

Rodrigo Horacio Zepeda Carreño

Marzo, 2013

Dirigida por: Francisca Bronfman Cáceres

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por:

Rodrigo Horacio Zepeda Carreño

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_ del Mes de Marzo de 2013

Directora de Tesis:

Dra. Francisca Bronfman. ....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Adrián Palacios. ....

Dr. Pablo Muñoz. ....

Dr. Pablo Caviedes. ....

Dr. Rodrigo Varas. ....

## DEDICATORIA

*A Dios, Sri Krishna, el origen y el fin de toda Ciencia, por permitirme llegar a la meta.*

*A mi maestro espiritual, Atulananda Acarya, por quien Su gracia fluye.*

*A mis padres, Angélica Carreño y Horacio Zepeda, por su incondicional amor y apoyo a lo largo de mi vida.*

*A mi querida hermana María José Zepeda y su esposo Cristián Orellana por siempre animarme a seguir adelante.*

*A mi sobrinita Amalia cuya dulzura inunda a toda mi familia.*

*A mí amada “llamita blanca”, Valentina Contreras, quien me llena de alegría, inspiración y una nueva vida.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Universidad de Valparaíso por recibirme en su programa de doctorado que gracias a su apoyo me fue posible avanzar humana y académicamente.

Quiero agradecer especialmente a mi tutora de tesis, la Dra. Francisca Bronfman por acogerme en su laboratorio, por guiarme, apoyarme tanto académica como humanamente en la realización de este trabajo.

Muchas gracias a Claudia Pissani por los buenos consejos, por enseñarme a realizar muchos de los experimentos que permitieron realizar mi tesis y sobre todo por ser una gran amiga.

Gracias también agradezco a Oscar Lazo por su compañerismo y disposición para ayudar a toda prueba, por compartir sus conocimientos dando siempre buenos y sabios consejos.

También le doy las gracias a cada uno de los demás integrantes con quienes componemos el Laboratorio de Neurobiología Celular y Regeneración NEUCREA: a Andrés González, Carolina Cabeza, Carolina Galleguillos, Claudia Escudero, Diego Ibañez, Juan Pablo Lezana y Pedro Piquer. La buena disposición, los consejos y constructivas observaciones de todos en cada reunión de laboratorio, fueron esenciales en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco especialmente a Valentina Contreras quien realizó experimentos de RT-PCR en el laboratorio y cuyos resultados apoyan esta tesis. Gracias por entregarme tu apoyo, consejos, amistad y compañía, pero por sobre todo tu amor, el cual me ha inspirado y llenado de nuevas energías durante la recta final en esta etapa de mi vida.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	vi
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Epidemiología y factores de riesgo del infarto cerebral .....	5
Tratamiento agudo del infarto cerebral.....	6
Patogénesis .....	7
Modelos animales de infarto cerebral, rehabilitación y recuperación funcional.....	8
Biomarcadores de plasticidad neuronal .....	11
Factores Neurotróficos: neurotrofinas .....	12
Uso de antidepresivos como estrategia neuromoduladora .....	14
Agentes de origen natural.....	16
Hipótesis de trabajo.....	17
Objetivos .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
Animales de experimentación .....	19
Cirugía .....	21
Administración de drogas .....	22
Entrenamiento pre-operatorio .....	22

Pruebas conductuales.....	22
Procesamiento del tejido.....	23
Determinación del tamaño de infarto.....	24
Inmunofluorescencia .....	24
Microscopía.....	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS .....	28
1. Evaluación del efecto neuroprotector de venlafaxina e IDN5706. ....	28
1a. Efecto de venlafaxina e IDN5706 en el tamaño del infarto. ....	28
1b. Efecto de venlafaxina e IDN5706 en la recuperación funcional luego de infarto cerebral focal inducido con endotelina. ....	28
2. Efecto neuroprotector y/o neuroplástico de venlafaxina en un modelo de infarto cerebral focal en ratas.....	35
DISCUSIÓN .....	44
Selección del modelo y estrategia experimental. ....	44
Venlafaxina e IDN5706 aumentan la recuperación funcional luego de un infarto cerebral focal. ....	45
Evaluación del efecto neuroprotector y/o neuroplástico de venlafaxina en un modelo de infarto cerebral focal en ratas usando diferentes marcadores celulares.....	46
Posibles mecanismos de recuperación funcional inducido por venlafaxina e IDN5706 .....	48
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Estrategia experimental utilizada en el estudio de dos agentes neuromoduladores sobre su efecto posterior a la inducción de un infarto cerebral.</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2. Vista esquemática de las coordenadas de inyección de endotelina-1 para la realización de un infarto focal cortical.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3. Metodología de cuantificación de expresión de marcadores moleculares.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 4. Efecto de venlafaxina e hiperforina en el tamaño de infarto</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5. Recuperación funcional analizada mediante prueba conductual de escalera horizontal.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 6. Efecto de venlafaxina sobre la recuperación funcional.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 7. Efecto de venlafaxina en la correlación entre tamaños de infarto y rendimiento motor en escalera horizontal.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8. Efecto del análogo de hiperforina (IDN5706), sobre la recuperación funcional.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 9. Inmunofluorescencia anti-GFAP.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 10. Inmunofluorescencia anti-OX42.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 11. Cuantificación de la intensidad de marca agregada de MAP2.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 12. Inmunofluorescencia MAP2.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 13. Inmunofluorescencia contra PSD95, Sinaptofisina y tinción neurotrace en un corte de cerebro infartado tratado con vehículo comparado con venlafaxina.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14. Cuantificación de la intensidad de marca entre los grupos infarto venlafaxina e infarto vehículo grupo.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 15. Inmunohistoquímica anti-GAP-43.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 16. Cuantificación de la expresión del mRNA de <math>tgf\beta 2</math> mediante RT-PCR.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17. Cuantificación de la expresión del mRNA de <math>bdnf</math> mediante RT-PCR.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 18. Cuantificación de la expresión del mRNA de <math>fgf2f</math> mediante RT-PCR.</b>	<b>52</b>

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AP	Anteroposterior
DV	Dorso ventral
Et-1	Endotelina-1
GFAP	Glia fibrillary acidic protein
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 $\beta$
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
ISRS	inhibidor selectivo de recaptación de serotonina
ISRSN	inhibidor selectivo de recaptación de serotonina y noradrenalina
M1	Corteza motora primaria
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MAP2	Microtubules associated Protein 2
MCAo	Medial Carotid Artery occlusion
ML	Medio lateral
NaBH <sub>4</sub>	Borohidruro de Sodio
NF- $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

activadas

PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerasa 1
PSD95	Post Synaptic Density protein of 95kDa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFL1	Corteza somatosensorial primaria de la pata delantera
SCFH	Standard Cubic Feet per Hours
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

Los eventos isquémicos cerebrales son cada vez más frecuentes en las sociedades modernas. Diversas estrategias de recuperación funcional en pacientes afectados están siendo estudiadas en la actualidad, siendo de particular interés aquellas estrategias que modulan la plasticidad neuronal posterior al infarto. En esta tesis, se ha estudiado el efecto, en la recuperación funcional y en la expresión de marcadores de inflamación e integridad neuronal, de dos neuromoduladores del sistema noradrenérgico y serotoninérgico: venlafaxina, un antidepresivo sintético de uso comercial y un análogo de hiperforina (IDN5706), de origen natural. Como modelo animal se utilizó la rata, sobre la cual se indujo un infarto cerebral mediante inyección intracortical de endotelina-1 en la región motora de la corteza cerebral. Específicamente, se estudió el efecto de estos neuromoduladores usando pruebas motoras como la escalera horizontal, de equilibrio en barra y cilindro, junto con estudiar el tamaño de infarto entre tratamientos y controles. Además, se logró profundizar en el efecto de venlafaxina sobre la expresión de marcadores como la proteína gliofibrilar ácida (GFAP, marcador de astrocitos), Integrina alfa-M/beta2 (OX42, marcador de la microglía), proteína asociada a microtúbulos (MAP2, marcador somatodendrítico), tinción para neuronas neurotrace (viabilidad), proteína asociada a crecimiento (GAP43, marcador de plasticidad), el marcador presináptico sinaptofisina y el marcador de densidad pos-sináptica PSD95. Venlafaxina, redujo significativamente los volúmenes de infarto cerebral y promovió un rendimiento motor significativamente mayor versus ratas infartadas tratadas con vehículo a lo largo de toda la curva de recuperación funcional en la prueba de la escalera horizontal. En la prueba de equilibrio, sólo se observaron diferencias significativas al final del tratamiento. Hiperforina, no logra disminuir el tamaño del infarto, sin embargo, se observó recuperación funcional de animales infartados tratados con hiperforina en la prueba de escalera horizontal, donde se

observa recuperación funcional sólo en la semana 2 del análisis conductual. Consistentemente con este resultado, en la prueba del cilindro se observa una recuperación funcional en las semanas 2 y 4 del análisis siendo la curva de recuperación de la bilateralidad significativamente diferente en las ratas infartadas y tratadas con hiperforina de las tratadas con vehículo.

A nivel celular, el infarto cerebral focal indujo un aumento significativo de los niveles de GFAP en los grupos infartados, la cual disminuyó con venlafaxina. Sorpresivamente, la disminución de GFAP, en ratas infartadas y tratadas con venlafaxina, se correlacionó con un aumento significativo de la expresión de OX42 en este mismo grupo comparado con ratas infartadas y no tratadas. A su vez, las ratas infartadas y tratadas con venlafaxina mostraron un aumento significativo de la tinción para MAP2 y sinaptoficina mientras que no se encontraron diferencias en la marca de PSD95 comparado con el grupo no tratado. GAP43 aumenta significativamente en los grupos infartados con respecto a los controles, sin embargo, en las ratas infartadas tratadas con venlafaxina se ve una mayor intensidad de marca con respecto al vehículo a medida que se aleja de la lesión. MAP2, aumenta significativamente su intensidad de marca en los cerebros infartados tratados con venlafaxina versus vehículo y controles.

En su conjunto estos datos sugieren que venlafaxina es efectivo en inducir recuperación funcional luego de un infarto cerebral focal en ratas mediante un mecanismo que implica la modulación de la glía cerebral lo que se traduciría en neuroprotección y/o neuroplasticidad, en cambio, el análogo de hiperforina parece inducir recuperación funcional por un mecanismos que implica mayormente aumento de plasticidad.

## ABSTRACT

Strokes is a brain ischemic events that is everyday more frequent in modern society. Several strategies for functional recovery of affected patients are being studied, between them are the ones aiming to regulate neuronal plasticity after stroke. In this thesis, we studied the effect of two neuromodulators of the noradrenergic and serotonergic system on motor functional recovery and the expression of neuronal integrity, neuronal plasticity and inflammatory markers in the infarcted rat brain. We used venlafaxine, a commercial synthetic antidepressant, and a botanical hyperforin analogue (IDN5706). As a model, we used rats with a cortical stroke induced locally in the motor cortex by injection of endothelin-1. Functional recovery after intracortical infarct was measured using the ladder-rung, beam-walking and cylinder test, besides the measurement of infarct volume. We also studied the effect of venlafaxine on the following cellular markers: Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP, an astrocyte marker), Integrin  $\alpha$ M/ $\beta$ 2 (OX42, a microglia marker), Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2, a somatodendritic marker), neurotrace staining (a viability marker), Growth-Associated Protein 43 (GAP43, a plasticity marker), a presynaptic marker synaptophysin and a Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95) marker. We found that venlafaxine significantly reduced the infarct volume and promoted a significantly higher motor performance than untreated infarcted rats along the whole recovery curve in the ladder-rung test. In the beam-walking test significant differences were only observed at the end of the treatment. On the other hand, hyperforin did not decrease infarct volume, however, we observed functional recovery along the whole curve of recovery in the cylinder test and a significant reduction of step folds, after 2 weeks of treatment, in the ladder rung.

At cellular level, the focal brain infarct induced a significant increase of GFAP levels, which was decreased with venlafaxine treatment. Surprisingly, the decrease of this marker was correlated with a significant increase OX42 on this treated group compared to untreated animals. Venlafaxine also caused a significant increase of MAP2 and synaptophysin, although there were

no differences found on the levels of PSD95. Finally, GAP43 increase in infarcted groups compared to controls. In addition, the treatment with venlafaxine increased the levels of GAP43 over the levels of infarcted rats treated with saline. This data suggests that venlafaxine treatment effectively induces functional recovery after a brain focal stroke in rats, through a mechanism that implies glia modulation, which may translate in neuroprotection and neuroplasticity. On the other hand, the hyperforin analogue seems to induce functional recovery through a mechanism that involves mostly an increase on plasticity.

## INTRODUCCIÓN

### **Epidemiología y factores de riesgo del infarto cerebral**

El infarto cerebral, es una de las primeras causas de muerte y discapacidad a nivel mundial (OMS 2004). En Chile, después del infarto al miocardio, es la segunda causa de muerte y representa al 9% de todas las muertes ocurridas al año 2005 (Minsal 2007) y al 10% durante el 2010 (INE 2010), con una tasa de mortalidad cercana al 28% de los casos dentro de los primeros 6 meses de ocurrido el infarto. Posee una incidencia de 130 por cada 100 mil habitantes y afecta principalmente a adultos mayores sobre los 75 años (Minsal 2007). El infarto cerebral, deja aproximadamente al 75% de los sobrevivientes con hemiparesia, es decir, con debilidad motora o parálisis de las extremidades de un lado del cuerpo después del infarto lo que mejora con el paso del tiempo (Gresham, Kelly-Hayes et al. 1998). Las enfermedades cerebrovasculares son la mayor causa de discapacidad en el mundo (Feigin, Lawes et al. 2003) de gran impacto económico y social en los países de más bajos ingresos, representando un importante desafío para la salud pública de los países de Latinoamérica y el Caribe (Lavados, Hennis et al. 2007).

Entre los factores de riesgos causales de infarto cerebral, están descritos: hipertensión arterial, diabetes, hipercolesterolemia, fibrilación atrial, enfermedades coronarias, tabaquismo, obesidad, la edad y el sexo siendo la población masculina la más afectada (Hankey 2006). Así, es crucial entender los mecanismos que llevan a esta recuperación y desarrollar estrategias para promover recuperación funcional en los pacientes (Carmichael 2003).

## **Tratamiento agudo del infarto cerebral**

En la clínica, la utilización de trombolíticos, como el activador tisular recombinante del plasminógeno (rt-PA), restablece el flujo sanguíneo de manera segura dentro de un período crítico no superior a las tres horas (Stemer and Lyden 2010). Además, ha resultado ser exitoso en la disminución de las secuelas de quienes sobrevive al infarto cerebral sin aumentar la mortalidad (NINDS 1995; Adams HP Jr 1996). Lamentablemente, esta corta ventana de tiempo impide que muchos pacientes lleguen a tiempo al centro asistencial (Candelario-Jalil 2009). Algo similar sucede con las estrategias relacionadas con el uso de drogas neuroprotectoras las cuales han centrado su desarrollo en la disminución o bloqueo de las moléculas que determinan la muerte neuronal. En el caso del infarto cerebral, han sido diseñados principalmente, inhibidores de receptores glutamato y de N-metil-aspartato (NMDA) para la modulación de la excitotoxicidad mediada por glutamato el cual contribuye al aumento de las concentraciones intracelulares de calcio, responsable del inicio de los procesos de estrés oxidativo y distintos mecanismos de muerte neuronal. Sin embargo, estos tratamientos no han tenido efectividad clínica debido a la exigua ventana temporal de efectividad (de tres a cuatro horas) que impide una atención oportuna en personas que sufren de un accidente cerebrovascular (Chavez, Hurko et al. 2009). El mismo argumento, se aplica en la utilización de agentes anti-inflamatorios, debido a que la liberación de citoquinas y quimoquinas, dentro de las primeras 24 a 48 horas de producido el infarto cerebral, dan cuenta de la mayor parte del daño neuronal en una zona hipoperfundida que rodea la lesión llamada penumbra (Savitz and Fisher 2007; Candelario-Jalil 2009).

Como consecuencia del proceso isquémico, las zonas cerebrales afectadas resultan inhabilitadas para realizar su función deteriorando el control motor además de inducir problemas cognitivos y sensoriales dependiendo de las regiones cerebrales afectadas (Donnan, Fisher et al. 2008).

## **Patogénesis**

El infarto cerebral isquémico ocurre cuando se presenta una reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo debido a oclusiones trombóticas o por ruptura de una arteria en un área del cerebro, lo que disminuye la llegada de oxígeno y glucosa. En una primera etapa, durante los primeros dos minutos de iniciado el evento, las neuronas que se han quedado sin oxígeno y nutrientes mueren en forma masiva producto de un aumento de los radicales libres y citotoxicidad generando una región conocida como el “núcleo” de la lesión (Lipton 1999; Murphy, Li et al. 2008).

Durante esta primera etapa, los astrocitos dejan de funcionar lo que hace que aumente excesivamente el glutamato extracelular ocasionando excitotoxicidad mediada por una sobre activación de los receptores glutamato. El receptor de NMDA, sensible a glutamato, se abre permitiendo la entrada de calcio, mientras que además, se activa el trasportador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  debido a la sobrecarga de sodio dentro de la célula, incrementando las concentraciones intracelulares de calcio. La bomba sodio-potasio no es capaz de compensar la sobrecarga de sodio debido a la falta de ATP en la célula, debido al consumo de la enzima reparadora de ADN, denominada PARP1 (Poly-ADP-Ribosa-Polimerasa-1). La sobrecarga de calcio induce la activación de deferentes enzimas entre ellas lipasas, proteasas y endonucleasas que iniciarán el proceso de degradación celular. Durante las siguientes horas, como consecuencia del aumento de calcio, se activa la enzima óxido nítrico sintasa neuronal, aumentando especies reactivas de oxígeno contribuyendo al estrés oxidativo celular. Esto ocasiona daño en las membranas celulares, y todas las proteínas que componen a la célula (Mehta, Manhas et al. 2007; Candelario-Jalil 2009).

En una segunda etapa, de horas a días, las neuronas vecinas al núcleo, que están hipoperfundidas pero no dañadas empiezan a morir producto de procesos del estrés oxidativo antes mencionado, apoptosis y neuroinflamación, formando una región denominada “penumbra”. La

región de la penumbra va aumentando su tamaño a medida que transcurre el tiempo de producida la lesión extendiendo el tamaño del infarto (Graham and Chen 2001; Lakhan, Kirchgessner et al. 2009).

El proceso neuroinflamatorio que ocurre 24 a 48 horas después de ocurrido el infarto cerebral, ocurre después de que la barrera hematoencefálica ha sido alterada por el daño isquémico. La lámina basal del endotelio se daña por el aumento de la actividad enzimática de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), tales como la MMP9 y la MMP2 y también a la excitotoxicidad dada por la sobrecarga de calcio por la isquemia ocurrida en las primeras horas del evento (Ceulemans, Zgavc et al. 2010). Esto desencadena una serie de eventos entre los que se incluyen: la liberación de citoquinas proinflamatorias, el incremento en la expresión de moléculas de adhesión endotelial, factores quimiotácticos, activación de la microglía y de los macrófagos y una infiltración de células leucocitarias. La inflamación, produce un aumento del volumen del tejido involucrado debido al edema, contribuyendo considerablemente con la patogénesis del infarto cerebral (Wang, Tang et al. 2007).

En la respuesta inflamatoria, participan elementos tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina-6, la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (IL-6) (Hossmann 2006; Wang, Tang et al. 2007) y agentes que inhiben el efecto del aumento de los radicales libres generados en el núcleo de la lesión en las primeras etapas de ocurrido el infarto cerebral los cuales ayudan a la extensión del tamaño de la lesión (Savitz and Fisher 2007).

### **Modelos animales de infarto cerebral, rehabilitación y recuperación funcional**

Para modelar las distintas etapas del infarto cerebral con animales en el desarrollo de terapias de rehabilitación pos-infarto cerebral, se han utilizado en primates, felinos y especialmente en roedores. (Kleim, Boychuk et al. 2007). A pesar de que el comportamiento motor es específico para cada especie, análisis detallados del movimiento de las extremidades revelan la existencia de estructuras motrices similares en las extremidades superiores humanas

y el movimiento de las patas delanteras en la conducta de búsqueda de las ratas (Whishaw, Suchowersky et al. 2002). Esta información ha permitido el desarrollo de una batería de pruebas motoras y sensoriales, las cuales son capaces de medir varios aspectos relacionados con el deterioro del rendimiento motor y con la posible recuperación luego del infarto cerebral (Kleim, Boychuk et al. 2007).

En nuestro laboratorio utilizamos un sistema de inducción de infarto cerebral focal en ratas mediante oclusión transitoria del flujo sanguíneo en una zona particular del cerebro por la acción vasoconstrictora del polipéptido Endotelina-1 (Et-1) (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988) Este vasoconstrictor reduce el flujo sanguíneo local produciendo un daño isquémico cuando es inyectado directamente en el tejido cerebral (Fuxe, Bjelke et al. 1997). La reducción del flujo sanguíneo es rápida, sin embargo no inmediata (Macrae, Robinson et al. 1993), y el fenómeno de reperfusión ocurre varias horas después (Biernaskie and Corbett 2001).

El perfil de la lesión ocasionada por la inyección de Et-1, resulta representativo del infarto cerebral humano debido a la presencia de eventos claves tales como el fenómeno de isquemia, donde se priva de sangre al tejido, y al de reperfusión, en el cual el tejido vuelve a ser irrigado, teniendo acceso a nutrientes y oxígeno nuevamente (Pulsinelli 1992; Kleim, Boychuk et al. 2007).

En la rata se ha descrito, que posterior al evento de infarto cerebral, existe un “período crítico”, en el cual es posible inducir recuperación funcional dependiente de actividad motora, mediante el uso de ambientes enriquecidos y entrenamiento físico. Este período, que tiene una ventana temporal de 9 días entre el día 5 y 14 pos-operatorios, es determinado por balances entre factores promotores e inhibitorios de la neuroplasticidad (crecimiento neuronal, sinaptogénesis y proliferación de espinas dendríticas) (Biernaskie, Chernenko et al. 2004; Murphy and Corbett 2009). Sin embargo, se sabe que aun después de este período, la rehabilitación en ambientes enriquecidos asociado a entrenamiento en pruebas motoras durante períodos prolongados de tiempo, pueden aumentar el porcentaje de recuperación funcional

cercano al 30%, lo cual implica un aumento de la plasticidad neuronal en áreas del cerebro no dañadas (Biernaskie and Corbett 2001). El incremento de la actividad motora, implica una activación de los circuitos neuronales que controlan el movimiento, especialmente en las regiones afectadas por el daño isquémico, promoviendo una reorganización de estas. Esta reorganización parece estar mediada en parte por liberación local de BDNF (Clarkson, Overman et al. 2011).

La recuperación funcional luego del daño isquémico depende de tres factores: la resolución o término del proceso inflamatorio inducido por el daño, el fenómeno de neuroplasticidad que se inicia a los pocos días luego de transcurrido el evento isquémico y la compensación conductual que ocurre en un periodo de semanas y meses. El infarto cerebral focal produce alteraciones en las propiedades de la red nerviosa en neuronas adyacentes y conectadas con la región dañada promoviendo excitabilidad y plasticidad sináptica de larga duración en distintas regiones del cerebro. Esta *plasticidad inducida por daño* genera alteraciones en la estructura y fisiología de las conexiones corticales, lo cual está correlacionado con la recuperación de los patrones conductuales, motores y sensitivos afectados por el infarto cerebral (Carmichael 2003; Metz, Antonow-Schlorke et al. 2005; Murphy, Li et al. 2008).

### **Plasticidad Inducida por infarto cerebral**

El aumento de excitabilidad generada durante los primeros días posterior al daño isquémico, está asociada a la reducción de la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria, a un aumento de la frecuencia de descarga eléctrica evocadas y a un aumento en la amplitud de pulso pareados excitatorios (Neumann-Haefelin, Hagemann et al. 1995; Buchkremer-Ratzmann, August et al. 1996; Redecker, Wang et al. 2002). Estos cambios en excitabilidad están relacionados con cambios en la citoarquitectura neuronal, como surgimiento de brotes y ramificaciones axonales, alteraciones en el árbol dendrítico y el establecimiento de nuevas conexiones sinápticas en neuronas que han perdido su blanco. Diferentes estudios con

trazadores neuronales han mostrado que estos cambios plásticos se traducen en un re-mapeo de la función motora perdida en regiones inmediatamente adyacente al daño isquémico. Esto, gracias al surgimiento de nuevas proyecciones corticales entre regiones distantes y adyacentes a la lesión indicando la existencia de conexiones entre núcleos corticales intra e inter hemisféricos (Carmichael and Chesselet 2002; Carmichael, Archibeque et al. 2005; Dancause, Barbay et al. 2005; Winship and Murphy 2008; Brown, Aminoltejari et al. 2009; Murphy and Corbett 2009; Takatsuru, Fukumoto et al. 2009).

### **Biomarcadores de plasticidad neuronal**

Uno de los elementos anatómicos clave involucrados en los fenómenos de plasticidad neuronal, es el brote axonal y los cambios de densidad que sufren en una determinada área del cerebro frente a diversos estímulos que rodean la región infartada, que en nuestro modelo corresponde a la corteza motora primaria de la rata. Uno de los marcadores moleculares de este aumento es la expresión de la proteína GAP-43 (Benowitz and Routtenberg 1997). Esta proteína de membrana, se encuentra presente en los conos de crecimiento, y está implicada en eventos de señalización en la modificación del citoesqueleto de actina (Aigner and Caroni 1993; Benowitz and Routtenberg 1997). Está descrito, que en las lesiones isquémicas, existe una sobreexpresión de GAP-43 a partir del día tres, la cual persiste hasta el día catorce en modelos de infarto mediante oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) en rata lo cual está correlacionado con un aumento significativo en la densidad de brotes axonales, sugiriendo que aumentos en los niveles de esta proteína participan en procesos de remodelamiento neocortical durante el período de recuperación funcional (Stroemer, Kent et al. 1995).

Otro marcador relevante en procesos de sinaptogénesis y brote axonal, es sinaptofisina. Esta proteína de 38 kda de peso molecular, es un marcador pre-sináptico de sinapsis maduras. Posterior al evento isquémico se sabe que en el momento en que los niveles de GAP-43 descienden a niveles controles, es decir al día 14 pos-infarto, sinaptofisina incrementa sus niveles persistiendo elevados hasta 60 días después del daño. Es interesante que elementos de

la vía de señalización activadas por BDNF y otras neurotrofinas, están implicados en la expresión de estas proteínas, como es el caso de la activación de la PLC- $\gamma$  cuya activación o inhibición, alteran los niveles de GAP 43 en cultivos celulares (Caprini, Gomis et al. 2003).

A nivel pos-sináptico, existen numerosos elementos moleculares que participan en procesos de plasticidad neuronal que forman parte de la denominada “densidad pos-sináptica” dentro de las cuales se encuentra una superfamilia de proteínas de membrana conocida como guanilato quinasa asociada a membrana (MAGUK) (Woods and Bryant 1993). PSD95 (por “post synaptic density protein of 95 kDa”), es una proteína adaptadoras perteneciente a esta familia, capaz de unir y agrupar, directa o indirectamente, en conglomerados a diferentes receptores de membrana, canales iónicos y proteínas de señalización subcelular (Larsson 2003). PSD95 juega un rol fundamental en la regulación de la expresión y función del receptor de NMDA, del receptor de serotonina 2a y 2c (5HT2R [a y c]), del receptor beta-1 adrenérgico ( $\beta$ 1AR) y del receptor 1 de dopamina (D1) (Magalhaes, Dunn et al. 2012). Estos dos últimos median respuestas de remodelamiento de la espina dendrítica relacionadas con la ansiedad y el estrés (Abbas, Yadav et al. 2009). Se sabe que posterior al daño isquémico, en modelos de MCAo en ratas, PSD95 disminuye drásticamente su expresión y se previene su disminución en tratamientos de ambiente enriquecido (Xu, Ye et al. 2009).

### **Factores Neurotróficos: neurotrofinas**

Las neurotrofinas son proteínas que participan en diversos procesos homeostáticos del sistema nervioso central y periférico, regulando procesos de supervivencia, muerte neuronal, mielinización, migración y extensión de procesos neuronales cruciales en la plasticidad neuronal (Chao 2003). Entre estos factores encontramos al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), y las neurotrofinas 3 y 4 (NT3, NT4). Las neurotrofinas actúan al unirse a dos principales grupos de receptores de membrana, los receptores tirosina quinasa (Trk) y el receptor de neurotrofinas p75. Existen tres tipos de receptores Trk, con afinidad específica para cada neurotrofina: TrkA que tiene por ligando a

NGF; TrkB que liga a BDNF y NT4; TrkC que liga preferencialmente a NT3. La unión ligando-receptor induce la autofosforilación de los receptores Trks activando distintas vías de transducción de señales, entre ellas la vía de las MAPKs (ERK1/2, ERK5, p38), la vía fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), la vía Cdc42/Rac/RhoG, y la vía de la fosfolipasa C-gamma (PLC- $\gamma$ ) (Huang and Reichardt 2001; Chao 2003). El receptor p75, posee afinidad por todas las neurotrofinas e incluso es capaz de unir formas inmaduras de las neurotrofinas, denominadas pro-neurotrofinas y péptidos amiloides. Su activación induce, a través de su dominio citosólico, una interacción con diversos adaptadores intracelulares permitiendo la supervivencia y crecimiento de neuritas, la muerte celular e inhibición del crecimiento de axones (Roux and Barker 2002; Bronfman and Fainzilber 2004).

Las neurotrofinas, se han visto involucradas en la plasticidad adaptativa y recuperación funcional inducida por infarto cerebral (Ploughman, Windle et al. 2009). Estudios en regeneración axonal, han mostrado que NT3 es capaz de regenerar procesos axonales posterior a lesiones de la médula espinal en ratón (Lu, Yang et al. 2004). La oclusión de la arteria cerebral medial (MCAo) en ratones mutantes deficientes en un alelo del gen de BDNF (*bdnf* -/+), los cuales expresan menos cantidades de la proteína de BDNF, generan tamaños de infarto mayores que en ratones de fenotipo silvestre, lo cual sugiere la existencia de un efecto neuroprotector del BDNF (Endres, Fan et al. 2000). Otra evidencia, es que la disminución de los niveles de BDNF mediante la inyección de una secuencia anti-sentido de BDNF en un modelo de isquemia focal en corteza cerebral motora en ratas, genera una disminución en la recuperación funcional inducida por rehabilitación (Ploughman, Windle et al. 2009). Por otra parte, en modelos de isquemia focal en ratón, se ha observado que tratamientos farmacológicos de administración de atorvastatina es, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, que disminuye la síntesis del colesterol con importantes efectos en la patogénesis del infarto cerebral ya que se ha observado que posee efectos anti-inflamatorios, antioxidantes, aumenta la expresión de iNOS e inhibe las MMPs (Jens Minnerup 2009) aumenta los niveles de BDNF, aumenta la proliferación neuronal, y la recuperación funcional (Chen, Zhang et al. 2005). Además de estos

estudios farmacológicos, se ha observado que la rehabilitación por aumento de la actividad motora, pos isquemia focal por MCAo en la corteza motora cerebral de rata, aumenta los niveles del ARN mensajero de BDNF y otros moduladores de la plasticidad sináptica como sinapsina I en rata, correlacionándose estos eventos con un aumento en la recuperación funcional (Ploughman, Attwood et al. 2007).

### **Uso de antidepresivos como estrategia neuromoduladora**

El uso de antidepresivos en estudios de depresión pos-infarto cerebral en humanos, han probado ser eficaces en aumentar la recuperación funcional de los pacientes, al ayudar en el aumento motivacional y más directamente, al actuar sobre funciones homeostáticas del cerebro relacionadas con plasticidad neuronal y neuroprotección. Estudios pos-mortem e *in vivo* en humanos, muestran un aumento en los niveles de BDNF en tejido hipocampal y en plasma sanguíneo en pacientes con depresión tratados con antidepresivos (Gervasoni N 2005). A su vez, entre los antidepresivos que han mostrado ser de gran utilidad, se encuentra venlafaxina un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina y noradrenalina, (ISRSN) que comparada con inductores de la re-captación de serotonina como reboxetina y fluoxetina posee una mejor tolerabilidad y eficacia en el tratamiento de la depresión (Smith, Dempster et al. 2002) y también comparado con antidepresivos tricíclicos como nortriptilina, amitriptilina e imipramina (activadores noradrenérgicos) (Brent et al., 2008; Cravello et al., 2009; Gaillard 2009). La vía clásica de señalización mediada por los receptores de serotonina acoplados a proteína G están relacionados con la activación o inhibición de las mismas vías de señalización de BDNF: vía adenilato ciclasa/PKA/CREB y activación de la vía de las MAPKs y Akt (Cowen 2007).

Distintos experimentos de modelos de infarto cerebral en los que se han utilizado diferentes fármacos antidepresivos han evidenciado que durante la isquemia cerebral global en ratón, venlafaxina e imipramina muestran un efecto modulador en moléculas claves durante la sinaptogénesis y plasticidad sináptica en el hipocampo, como por ejemplo BDNF, GAP43,

sinaptofisina y proteínas de adhesión celular, no así fluoxetina que induce cambios en GAP43, pero no en los niveles de BDNF (Fang S 2008; Czubak A 2009). En modelos de estrés se ha reportado una regulación negativa de distintas variantes de transcritos para BDNF. El tratamiento (activación noradrenérgica) con la imipramina, induce un aumento de la acetilación del promotor y expresión de transcritos que codifican BDNF sugiriendo que la imipramina tiene un efecto en la activación de enzimas remodeladoras de la cromatina como las acetilasas, regulando la expresión de BDNF y probablemente otros factores tróficos y de esta forma, la plasticidad neuronal (Tsankova, Berton et al. 2006).

Evidencia clínica apunta a una mayor recuperación funcional en pacientes humanos con depresión pos-infarto durante el tratamiento con antidepresivos activadores del sistema noradrenérgico con nortriptilina (antidepresivo tricíclico) versus activación del sistema serotoninérgico con fluoxetina (ISRS), observándose un aumento en la recuperación de las capacidades motoras solo por nortriptilina (Robinson, Schultz et al. 2000). A partir de estos hallazgos, se han desarrollado estudios en modelos de isquemia en ratón y en rata, observándose un aumento en la recuperación de las capacidades motoras en ratas infartadas por inyección de Et-1 tratadas con D-anfetamina (Gilmour, Iversen et al. 2005), pero no con fluoxetina (Windle and Corbett 2005) sin embargo se ha observado que la estimulación del sistema serotoninérgico con fluoxetina en modelos de infarto cerebral por MCAo, confiere neuroprotección disminuyendo los tamaños de infarto (Lim, Kim et al. 2009). Otro hallazgo importante, mediante neuroimágenes en humanos, es una reorganización en la conectividad neuronal junto a un aumento en la recuperación de la actividad motora producto de la estimulación del sistema noradrenérgico con dosis únicas de reboxetina (Wang, Fink et al. 2010). Estos datos en su conjunto sugieren que los antidepresivos podrían ser usados para aumentar la capacidad plástica del cerebro infartado.

## **Agentes de origen natural**

La búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de diversas patologías, le ha dado un nuevo impulso al desarrollo de la medicina natural como complemento de la tradicional. Diversas investigaciones, enfocadas en el estudio de numerosos compuestos presentes en variados extractos vegetales, han demostrado su efectividad como agentes neuroprotectores y neuromoduladores en estudios de daño isquémico cerebral (Wu, Zhang et al. 2010). Estos compuestos ejercen su acción sobre uno o más sistemas de transducción de señales induciendo procesos anti-inflamatorios, antioxidantes, antiapoptóticos y regulando la función de las neuronas disminuyendo los efectos del infarto cerebral cuando son administrados antes del infarto cerebral (Wu, Zhang et al. 2010).

Durante la última década, se ha hecho popular entre la población moderna, el consumo de la hierba de San Juan, conocida su efecto benéfico en el estado anímico, ha sido utilizada por la medicina tradicional por su efectividad en el tratamiento de desórdenes depresivos moderados y sus propiedades ansiolíticas (Linde K 2005; Caccia S 2009). Se le han encontrado funciones análogas a antidepresivos de acción dual y tricíclicos tales como imipramina, reboxetina y venlafaxina entre otros, ya que tiene la capacidad de inhibir la recaptura de serotonina (5-HT o 5-hidroxitriptamina), noradrenalina y dopamina, aumentando la actividad monoaminérgica (Singer, Wonnemann et al. 1999).

**La hiperforina**, el componente activo de la hierba de San Juan, es un derivado del acilfloroglucinol que se utiliza como medicina alternativa y eficaz para la depresión moderada (Linde K 2005). Su mecanismo de acción consiste en reducir la recaptura de monoaminas: serotonina, dopamina y noradrenalina, elevando las concentraciones intracelulares de sodio y calcio, disminuyendo la fuerza motriz de los transportadores de neurotransmisores (Singer, Wonnemann et al. 1999; Wonnemann M 2000). Estudios in vitro sugieren que este fenómeno, depende de la activación específica de los receptores canónicos de potencial transitorio 6 (TRPC6) por hiperforina (Leuner, Kazanski et al. 2007), posee además antagonismo por los

receptores de NMDA, y posee actividad antioxidante y anti-inflamatoria, además de participar en procesos de neuroprotección en la enfermedad de Alzheimer (Griffith TN 2010). Tetra-hidro-hiperforina (IDN5706), un análogo semi-sintético de hiperforina, esta descrito que posee una mayor biodisponibilidad y estabilidad, junto con mostrar efectos neuroprotectores en modelos de Alzheimer en ratas (Inestrosa, Tapia-Rojas et al. 2011)

En nuestro laboratorio, hemos montado un modelo animal de infarto cerebral focal sobre la corteza motora en rata, sobre el cual evaluaremos el efecto de dos neuromoduladores del sistema noradrenérgico y serotoninérgico: Venlafaxina, una droga comercial utilizada para el tratamiento de la depresión mayor e Hiperforina, el componente activo de la hierba de San Juan utilizado popularmente por sus propiedades antidepressivas, sobre parámetros conductuales de recuperación funcional motora y su posible rol en procesos de neuroprotección y plasticidad neuronal.

### **Hipótesis de trabajo**

“La administración de venlafaxina o hiperforina en ratas sometidas a un modelo de isquemia focal sobre la corteza motora primaria, confiere neuro-protección y regula elementos inductores de la plasticidad neuronal, aumentando la eficacia de la recuperación funcional”.

### **Objetivos**

#### **General**

**Caracterizar el efecto neuroprotector, neuroplástico y funcional de venlafaxina o hiperforina en un modelo de infarto cerebral focal en ratas.**

#### **Específicos:**

**1.- Evaluar el tamaño del infarto cerebral inducido por endotelina 1 en ratas tratadas con venlafaxina o hiperforina y su correlación con la recuperación funcional en un modelo de infarto cerebral focal en ratas.**

Se evaluará el efecto de Venlafaxina o Hiperforina administradas pos-infarto en el tamaño del infarto cerebral. El volumen del infarto focal se analizará mediante tinción vital con 2, 3, 5-trifenil cloruro tetrazolium (TTC). La recuperación funcional será medida mediante el análisis de patrones conductuales utilizando dos pruebas motoras. La primera, denominada de escalera horizontal o "Ladder Rung", que permite analizar la destreza motora de la extremidad impedida. Como segunda prueba, se utilizó el "balance en vara" para medir equilibrio y la prueba del cilindro para medir la simetría del uso de las extremidades.

**2. - Evaluar el efecto neuroprotector y/o neuroplástico de venlafaxina en un modelo de infarto cerebral focal en ratas usando diferentes marcadores celulares.**

Se analizará mediante inmunofluorescencia, la expresión de marcadores de viabilidad y estructura neuronal (utilizando anticuerpos contra Neurotrace, MAP2), marcadores de neuroinflamación (microglía y glía activada) luego del infarto en corteza motora versus controles y en la expresión de marcadores de plasticidad neuronal (GAP43, sinaptofisina y PSD95).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para probar nuestros objetivos, elaboramos una estrategia experimental que consistió en habituar ratas a un ciclo de luz invertido por una semana para poder trabajar con ellas en su fase nocturnas cuando son más activas. Los test conductuales de la escalera horizontal y la prueba de la vara, requiere de 2 sesiones diarias durante 3 días de entrenamiento y luego son operadas. Una vez inducido el infarto, a un grupo de ratas se les suministra dosis diarias de venlafaxina y a otro grupo un análogo de la hiperforina (IDN5706) cada 2 días de. Cada 3 días se colectaron videos con los rendimientos motores en distintas pruebas conductuales: escalera horizontal, vara y cilindro y se agruparon en semanas. Finalmente las ratas fueron sacrificadas, los cerebros procesados y se realizó una batería de análisis histológicos que incluyen marcadores de integridad neuronal, neuroinflamación y plasticidad neuronal. La estrategia experimental utilizada para el estudio del efecto de los neuromoduladores, se encuentra resumida esquemáticamente (Fig. 1).

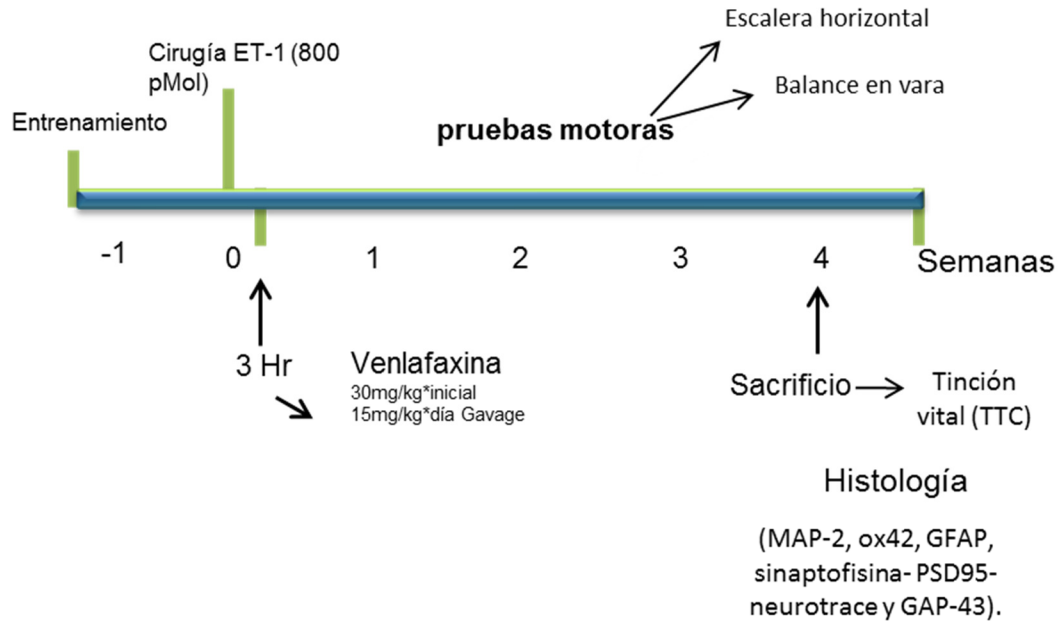
### **Animales de experimentación**

Se utilizaron Ratas *Sprague Dawley* macho (250-310 g) provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile), las cuales fueron alimentadas *ad-libitum* y mantenidas en cajas bajo un ciclo de luz invertido de 12:12 horas luz.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

## Estrategia experimental: Venlafaxina

Animales: Ratas Sprague Dawley ~ 250g,  
C.I. 12/12 hrs



## Estrategia experimental: Hiperforina (IDN5706)

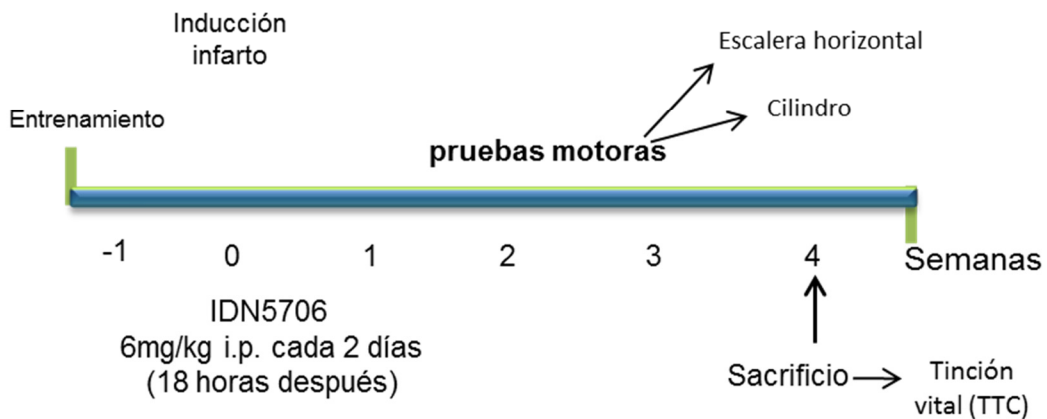
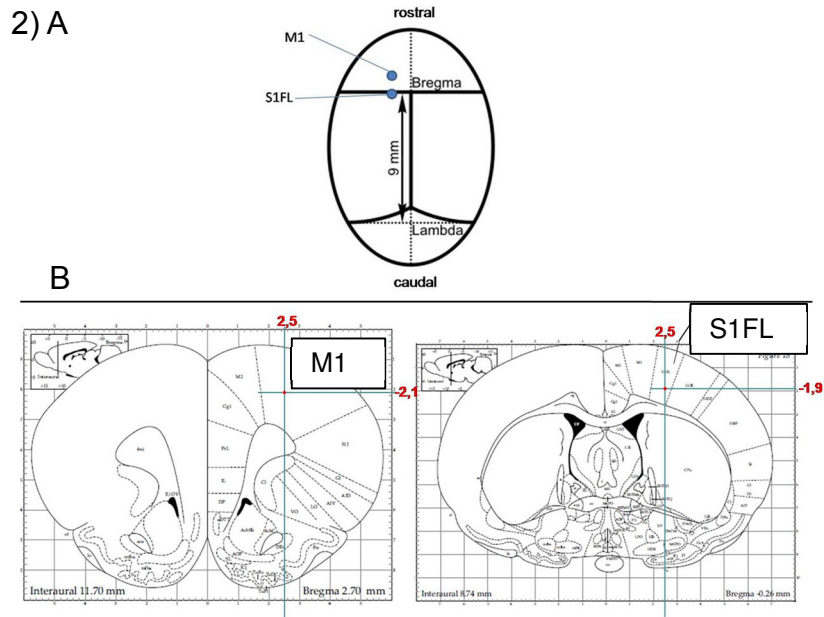


Figura 1. Estrategia experimental utilizada en el estudio de dos agentes neuromoduladores sobre su efecto posterior a la inducción de un infarto cerebral. A. estrategia utilizada administrando venlafaxina. B. Estrategia utilizada utilizando el análogo de hiperforina IDN5706. Grupos experimentales: infarto vehículo, infarto IDN5706, sham vehículo y sham IDN5706

## Cirugía

Los animales fueron anestesiados con una inducción de isoflurano al 4% disuelto en oxígeno (99,5% de O<sub>2</sub>) mezclado con aire y suministrado a 6 pies cúbicos estándar por hora (SCFH), durante 4 minutos, posteriormente la cabeza de la rata se ubicó en un aparato estereotáxico con una dosis de mantención de isoflurano al 2%. Posteriormente, se administraron 0,3 ml de Ketoprofeno 1% y 0,1 ml de atropina (1mg/ml) en forma intraperitoneal (I.P.). Luego se procedió a realizar sobre el cráneo de la rata, utilizando un mini taladro, dos orificios en las siguientes coordenadas estereotáxicas respecto a bregma: antero-posterior (AP) + 0,0, medio lateral (ML) – 2,5 (hemisferio derecho, orificio 1, O1) y AP + 2,3 (orificio 2, O2); ML +2,5 (hemisferio izquierdo), correspondientes a la zona de la corteza motora primaria M1 y a la corteza somatosensorial de la pata delantera (S1FL) (Paxinos 1997) (Fig. 2). Posteriormente las ratas son infartadas mediante la inyección de Et-1 (400 pMol por inyección, 800 pMol totales en solución salina, NaCl 0,9%) en cada uno de los orificios a una profundidad dorso ventral (DV) - 2,1 para O1 y DV -1,9 para O2.



**Figura 2.** Vista esquemática de las coordenadas de inyección de Endotelina-1 para la realización de un infarto focal cortical. A) vista de los sitios de inyección desde dorsal. B) esquemas coronales que muestran las coordenadas y profundidad de la inyección de ET-1.

## **Administración de drogas**

Se administra una dosis inicial de venlafaxina (30 mg/kg\*rata) 3 horas después de la operación y dosis crónicas de venlafaxina 15mg/kg\*día mediante gavage. Para esto, los animales fueron anestesiados con una inducción de isoflurano al 4% disuelto en oxígeno (99,5% de O<sub>2</sub>) mezclado con aire y suministrado a 6 pies cúbicos estándar por hora (SCFH), para luego canularlos orofaríngeamente. La cánula utilizada es suficientemente larga como para llegar a la cavidad gástrica y poder depositar la dosis directamente en el estómago. Tetra-hidro-hiperforina (IDN5706) es administrada intraperitonealmente a una concentración de 6 mg/kg cada 2 días.

## **Entrenamiento pre-operatorio**

Ratas con las características descritas anteriormente, fueron entrenadas durante 3 días en 2 sesiones diarias en una batería de pruebas conductuales: prueba de escalera horizontal, con la cual se evalúa coordinación motora; prueba de balance en vara, que mide el equilibrio del animal; y la prueba de cilindro, con la que se estudia la preferencia de uso de las extremidades delanteras. El día anterior a la operación las ratas son grabadas para el posterior análisis.

## **Pruebas conductuales**

*Prueba de escalera horizontal:* se evaluó el rendimiento motor de la rata al cruzar por una serie de barras distanciadas de manera aleatoria intervalos irregulares entre 1cm y 5cm apoyadas sobre 2 tablas acrílicas transparentes de 20 x 100 cm y suspendida a 30 cm del mesón de trabajo. Se cuantifican las caídas de la extremidad impedida los resultados se ponderaron por los pasos totales dados con esa extremidad en todo el aparato (Metz and Whishaw 2009).

*Prueba de balance en vara:* El objetivo de esta prueba es evaluar el equilibrio y coordinación de los animales al caminar sobre una superficie angosta: barra de un metro de longitud y elevada a un metro de altura, se cuantifican solo los pasos de la extremidad impedida dados sobre la barra y se ponderan por el tiempo de cruce. Para la evaluación del desempeño

motor se contaron los pasos dados sobre la vara, y el tiempo que se demoraban en atravesar la prueba completa. Dividiendo los pasos por el tiempo se obtuvo un score del desempeño motor de los animales en este test motor (Kleim, Boychuk et al. 2007).

*Prueba del cilindro:* en un cilindro transparente de 30cm de altura se cuantifica el número de apoyos en las paredes del cilindro y se determina la simetría en el uso de las extremidades del animal. El curso temporal de los estudios conductuales consistió en grabar a las ratas cada 3 días después de la operación los cuales fueron agregados y expresados en semanas: Pre-operatoria, Pos-infarto (semana 1, día 3), semana 2 (días 6 y 9), semana 3 (días 12 y 15) y semana 4 (día 18 y 21).

### **Procesamiento del tejido**

Terminado el procedimiento experimental las ratas fueron anestesiadas profundamente con una inyección intraperitoneal de 0,3 ml de Ketamina (10%) con Xilacina (2%) en proporción 2:1 y sacrificadas por decapitación. Luego, los cerebros fueron removidos de la cavidad craneana para luego ser rebanados en secciones coronales de 2 mm sobre una matriz acrílica, y mantenidas en solución buffer PBS1x y teñidas en una solución de TTC en tampón fosfato salino (PBS) 1X. Estas secciones fueron utilizadas para la determinación del volumen de infarto.

Para la realización de las inmunofluorescencias, el tejido fue procesado de la siguiente manera: Las ratas fueron anestesiadas del modo descrito anteriormente. Luego, los cerebros fueron perfundidos con solución salina (NaCl 0,9%) y luego con PFA al 4%. Los cerebros son removidos de la cavidad craneana y posteriormente rebanados en secciones coronales de 2 mm. Luego, las secciones de 2mm fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4%, crioprottegidos en 20% de sacarosa y congelados a menos 80°C. Posteriormente fueron cortadas en criostato (Leica CM 1850) con un grosor de 40 µm para la realización de las inmunofluorescencias.

### **Determinación del tamaño de infarto**

Para calcular el tamaño del infarto se utiliza el hemisferio contralateral a la lesión como referencia, de manera que se mide el tamaño del hemisferio contralateral a la lesión, se resta su valor con el lesionado, y el valor obtenido se divide por el tamaño del hemisferio contralateral. El tamaño del infarto, es una medida de volumen y los valores expresados en porcentaje, se calcularon con la siguiente formula de **volumen de infarto**:

$$\frac{(A1-Ai1) + (A2-Ai2) + (A3-Ai3) + (A4-Ai4) + (A5-Ai5)}{(A1 + A2 + A3 + A4)} \times 100$$

### **Inmunofluorescencia**

Se seleccionaron y rebanaron cortes de cerebro entre las regiones entre bregma (0,0) a rostral (hasta +2,3) en criostato a un grosor de 40 µm y se dejan en tampón tris salino (TBS) 1x y se procedió con el protocolo de tinción. Los anticuerpos utilizados son: monoclonal de ratón anti-MAP2 (1:200); policlonal de conejo anti-GFAP (Temecula, CA, USA); monoclonal de ratón anti-OX42 (Serotec, 1:100); policlonal de conejo anti-PSD95 (abcam, 1:700); monoclonal de ratón anti-sinaptofisina (abcam, 1:250). Estos anticuerpos fueron revelados con secundarios fluorescentes. Se utilizó la tinción Neurotrace (1:200) y Hoescht (1:5000). Se utilizó un protocolo general de inmunofluorescencia para cortes flotantes: los cortes previamente lavados en TBS1x, se incubaron por 10 minutos en una solución de glicina al 0,15M a un pH 7,4 con agitación. Luego de esto los cortes fueron lavados nuevamente en una solución de TBS1x con el detergente Tritón X100 al 0,3%. Luego de realizado este lavado los cortes fueron incubados nuevamente por 10 minutos en una solución de borohidruro de sodio (NaBH4) 10mg/ml con agitación. Luego de retirar la solución de NaBH4 de los cortes, se bloquearon y permeabilizaron por una hora y media con una solución de TBS1x con Tritón X100 0,3% y BSA al 5%. Los cortes permeabilizados y bloqueados fueron incubados por 24 horas a 4°C con agitación con los anticuerpos primarios, según las diluciones descritas anteriormente para cada uno. Al día siguiente, los cortes fueron lavados con TBS1x, e incubados por 2 horas en una solución de

TBS1x con BSA al 5% con el anticuerpo secundario fluorescentes correspondiente (policlonal de burro contra ratón marcado con Alexa 488 y policlonal de burro contra conejo marcado con Alexa 555 y diluido 1:500 (ambos policlonales son de Molecular Probes). Pasadas las 2 horas los cortes fueron lavados en TBS 1x y montados con mowiol en portaobjetos gelatinizados previamente. La marca con policlonal de conejo anti-GAP43 (abcam, 1:500), se obtuvo mediante la aplicación de un protocolo general para inmunohistoquímica (IHQ): Se procedió de maneja similar al protocolo de inmunofluorescencia salvo que no se utilizaron glicina ni NaBH<sub>4</sub>. Los cortes fueron incubados en una solución de TBS1x con BSA al 5% con el anticuerpo secundario biotinilado, policlonal de burro contra ratón durante 2 horas. Los cortes fueron lavados en TBS 1X y se incubaron en una solución A+B proveniente del Kit Vectastain para la visualización posterior con diaminobencidina (DAB) durante 90 minutos. Posteriormente se incubaron los cortes en una solución DAB (Invitrogen Labs. Kit) durante 5 minutos y fueron lavados 3 veces en TBS 1X y una vez en agua destilada antes de montar en el porta-objetos. Finalmente, los cortes fueron deshidratados en una batería de alcohol, aclarados en xilol y cubiertos con entellan.

### **Microscopía**

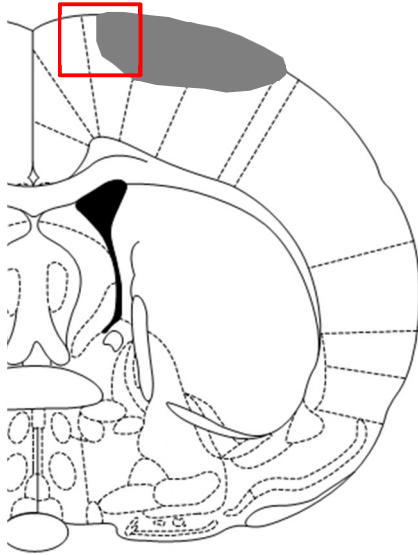
La marca de GFAP, OX42, MAP-2 fue visualizada usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 (Tokyo, Japón) equipado con una cámara digital conectado a un computador con el software de captura Image-pro express (Media Cybernetics, Maryland, USA). Se cuantificaron estos marcadores moleculares mediante un perfil intensidad de marca utilizando trazos de 700  $\mu\text{m}$  sobre la imagen desde el inicio de la penumbra (Fig. 3) (Neumann-Haefelin, Staiger et al. 1998; Asnes, Marquez et al. 2006). Las muestras marcadas con PSD95, Sinaptofisina y Neurotrace se visualizaron mediante microscopia confocal utilizando el microscopio Olympus FV1000 y se analizó la intensidad de marca en campos completos de las microfotografías adquiridas. GAP43 se cuantificó analizando la intensidad de marca en campos claros completos utilizando el microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 (Tokyo, Japón). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. Se cuantificaron 3 cortes por

animal y una fotomicrografía alrededor del área infartada por cada corte. El total de animales es de 4 para cada grupo experimental.

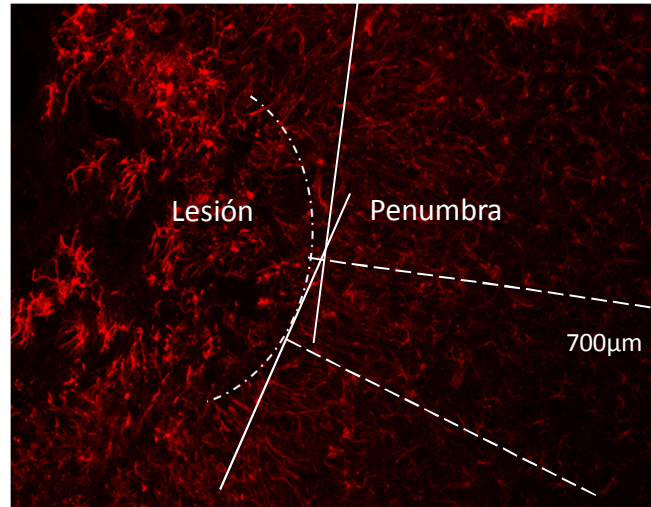
### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos expresados en porcentajes, fueron normalizados utilizando la función arco seno y se compararon mediante análisis de varianza de dos vías seguido de post-test de bonferroni y pruebas de t usando el software estadístico GraphPad 5.0.

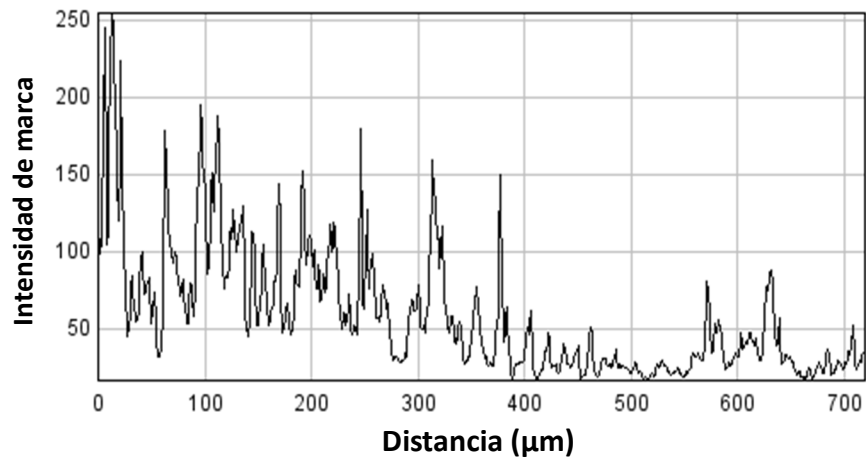
3) A



B



C



**Figura 3.** Metodología de cuantificación de expresión de marcadores moleculares. A) Áreas de estudio. La zona gris representa la zona infartada el recuadro, el lugar donde se tomaron las microfotografías. B) microfotografía tamaño 10X del área infartada y su vecindad. La línea entrecortada curva delimita la penumbra con el lugar de la lesión. La línea blanca representa una tangente a la curva. Posteriormente, se traza una línea entrecortada perpendicular a la tangente de 700 $\mu\text{m}$  de la cual se obtiene un perfil de intensidad de marca mostrado en C, cuyos valores se agregan y promedian en intervalos de 100  $\mu\text{m}$  y se comparan hasta los 700 $\mu\text{m}$  (2 líneas por corte).

## RESULTADOS

### 1. Evaluación del efecto neuroprotector de venlafaxina e IDN5706.

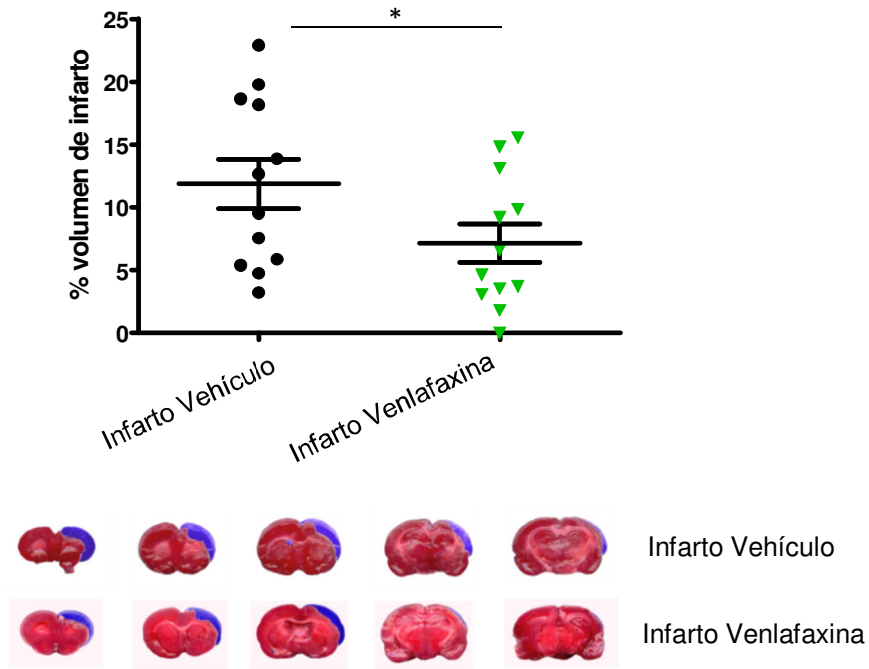
#### 1a. Efecto de venlafaxina e IDN5706 en el tamaño del infarto.

Nuestro primer objetivo consistió en estudiar si el tratamiento con los neuromoduladores venlafaxina y hiperforina, disminuye el tamaño de infarto. Nuestros resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos de ratas infartadas tratadas con vehículo (12 +/- 2%, n=12) comparadas con el grupo de ratas infartadas y tratadas con venlafaxina (7 +/- 2%, n=13),  $p=0,035$  (Fig. 4A). En cambio, el tratamiento con el neuromodulador IDN5706 no tuvo efecto en el tamaño del infarto puesto que no se observaron diferencias significativas entre los grupos infartados vehículo (7 +/- 3%, n=4) y aquellas ratas infartadas y tratadas con hiperforina (10 +/- 4%, n=4),  $p=0,23$  (Fig. 4B).

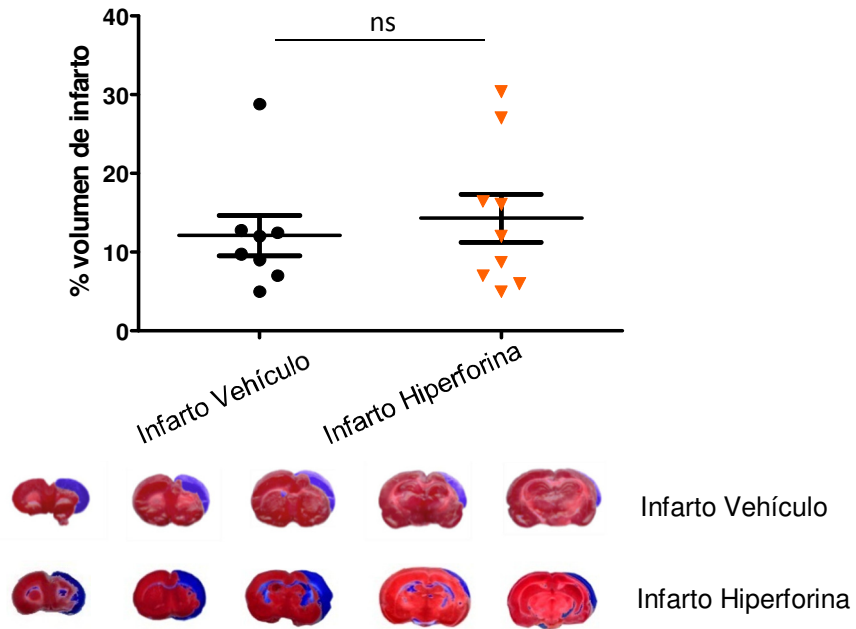
#### 1b. Efecto de venlafaxina e IDN5706 en la recuperación funcional luego de infarto cerebral focal inducido con endotelina.

Como primera aproximación quisimos estudiar si el hecho de realizar la prueba motora de barra horizontal, alteraba el proceso de recuperación pos-infarto. Nuestros análisis mostraron que no existen diferencias significativas ( $p=0,17$ ) al comparar el rendimiento motor de 2 grupos (n=5) de ratas infartadas en puntos de análisis temporal distinto, el primer grupo a los 3 y 15 días pos-infarto, y el segundo, cada 3 días en ese mismo período de tiempo (Fig. 5).

4 A)



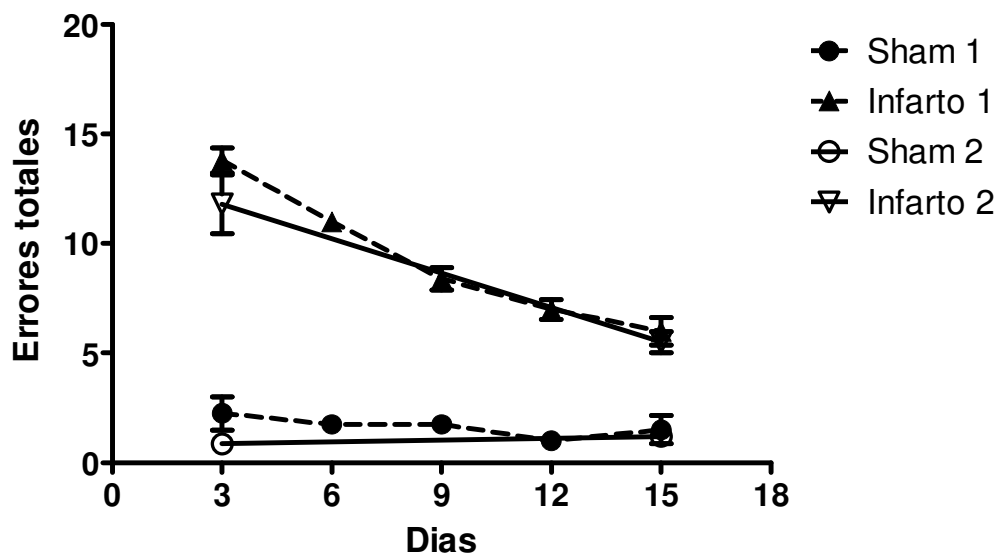
B



**Figura 4.** Efecto de venlafaxina e hiperforina en el tamaño de infarto. Gráfico de barras de la izquierda, muestra el volumen promedio (en porcentaje) del tamaño de infarto hemisférico en ratas tratadas con neuromodulador versus Vehículo. A la derecha, imágenes representativas de los infartos obtenidos en ratas tratadas con Venlafaxina (I) y Vehículo (II). A) Tratamiento con venlafaxina. N = 12. Estadística: t-test, P=0,035 B) Tratamiento con Hiperforina. N=4. ns: no significativo.

5)

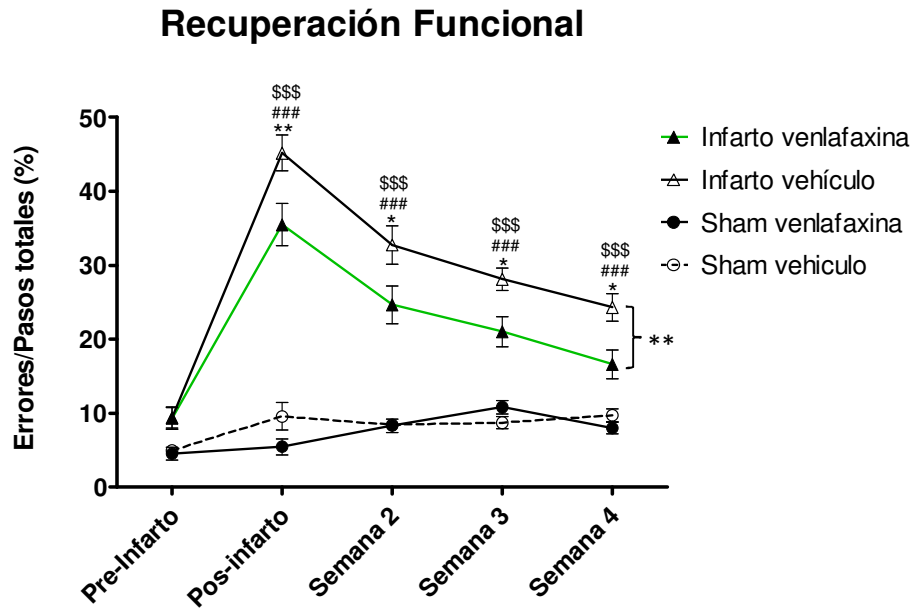
## Recuperación Funcional



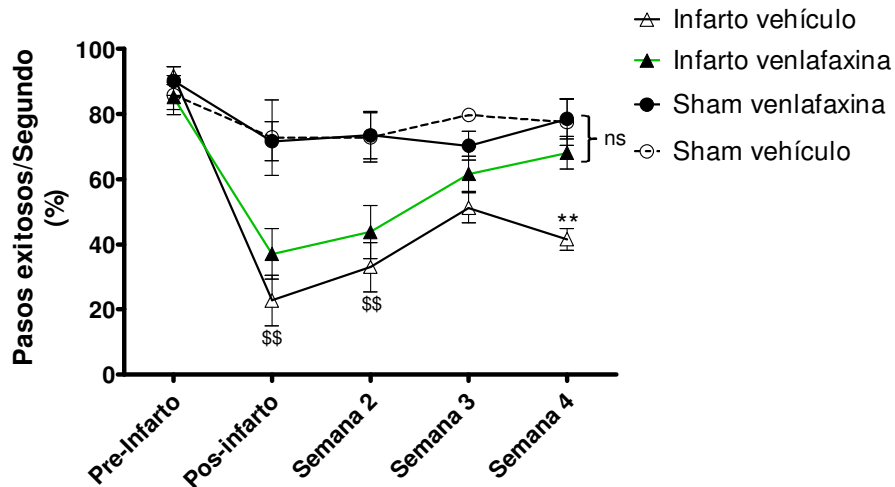
**Figura 5.** Recuperación funcional analizada mediante prueba conductual de escalera horizontal. Análisis en dos puntos de medición: días 3 y 15 (triángulos y círculos en blanco) y análisis en cinco puntos de medición: días 3, 6, 9, 12 y 15 (triángulos y círculos en negro). N=5 por grupo.

Posteriormente evaluamos el efecto del tratamiento con venlafaxina en ratas infartadas comparándolo con ratas infartadas tratadas con vehículo (sham). El tratamiento con venlafaxina, aumentó el rendimiento motor en ratas infartadas (n=13). De hecho, al ser tratadas con venlafaxina las ratas infartadas presentan una disminución en el número de errores/pasos totales (%) a lo largo de toda la curva temporal en la prueba de *escalera horizontal* (Fig. 6A) comparados con las ratas infartadas tratadas con vehículo (n=12) y no se observa un efecto del neuromodulador en los individuos sham tratados con venlafaxina (n=5) versus los controles sham tratados con vehículo (n=6). Las ratas infartadas y tratadas con venlafaxina también mostraron recuperación funcional en la *prueba de la vara* (Fig. 6B), sin embargo, solo se observan diferencias significativas entre los grupos infarto vehículo (n=7) y venlafaxina (n=7) al final del estudio (semana 4).

6) A



B



**Figura 6.** Efecto de venlafaxina sobre la recuperación funcional en ratas infartadas tratadas con vehículo y venlafaxina versus sham venlafaxina y sham vehículo. A. Prueba de escalera horizontal. Se indica la frecuencia de errores de la pata impedida en porcentaje. B. Prueba de balance en vara. Se muestra la frecuencia de los pasos exitosos (en porcentaje) sobre la barra. Tiempos de análisis: Pos-infarto, semana 2- 4. Estadística: ANOVA de dos vías y análisis de bonferroni. No se incluye en el análisis estadístico el punto Pre-infarto (\*) Infarto venlafaxina (n=13) vs Infarto vehículo (n=12). (#) Infarto vehículo vs Sham vehículo y Sham venlafaxina. (\$) Infarto venlafaxina vs Sham vehículo y Sham venlafaxina. \* p<0,05;

No se observaron diferencias significativas entre las ratas controles tratadas con venlafaxina comparadas con los grupos controles tratadas con salino. Estos datos muestran que la administración pos-infarto de venlafaxina aumenta la recuperación funcional posiblemente a través de la modulación de eventos celulares tempranos entre los cuales podrían estar involucrados eventos de neuroprotección y/o neuroplasticidad.

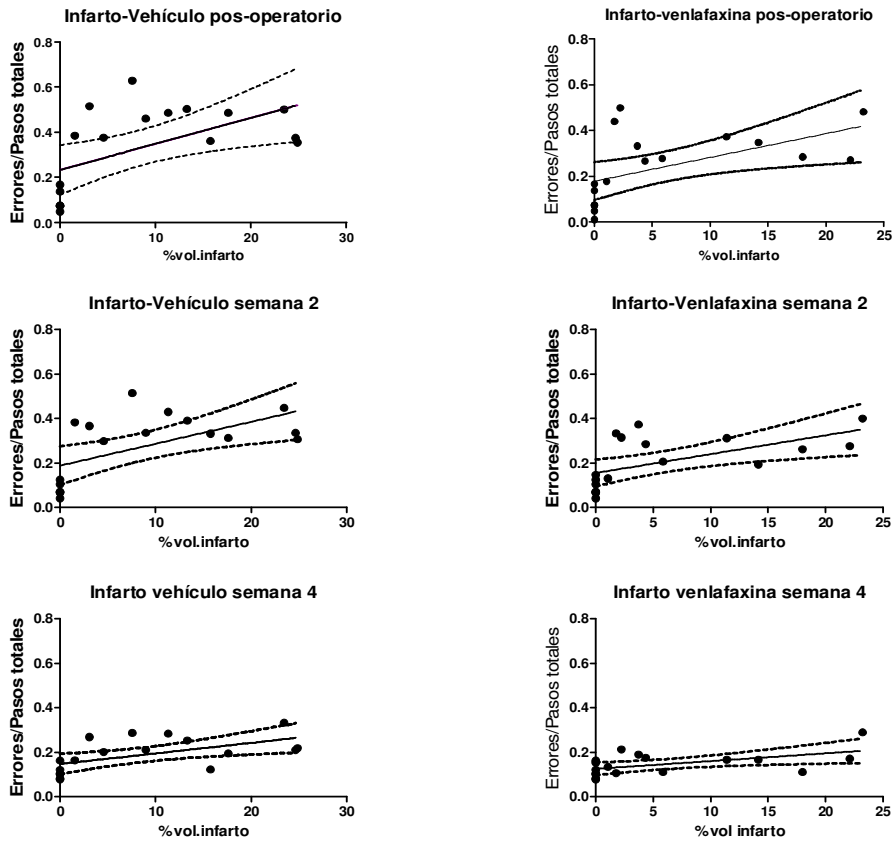
De los resultados obtenidos en la escalera horizontal con las ratas infartadas tratadas con venlafaxina, se estudió si existe relación entre el tamaño del infarto y el rendimiento motor (Fig.7A). No se observó una correlación entre el tamaño del infarto y el rendimiento motor en ninguno de los puntos temporales analizados (semana 1 o pos-operatoria, semana 2 y semana 4) siendo los valores de  $r^2$  inferiores a 0,4;  $p > 0,05$  (Fig. 7B), indicando que la reducción de los tamaños de infarto, no significa una mejor respuesta motora.

Posteriormente estudiamos si el tratamiento con el análogo de hiperforina IDN5706, tiene un efecto en la recuperación funcional durante la prueba conductual de *escalera horizontal*. No observamos diferencias significativas cuando analizamos la curva temporal de los grupos infartados tratados con el neuromodulador (n=8) comparados con el vehículo (n=8) ( $p=0,21$ ) aunque ambos grupos presentan mayor número de errores/paso comparados con los grupos sham ( $p < 0,05$ ; n=6) (Fig.8A). Sin embargo, cuando se hizo un análisis puntual, se observó que a las dos semanas, las ratas infartadas y tratadas con IDN5706 presentan un menor número de errores comparado con las ratas vehículo ( $p < 0,05$ ; n=8). Sugiriendo que el IDN5706 acelera la recuperación funcional en ratas infartadas.

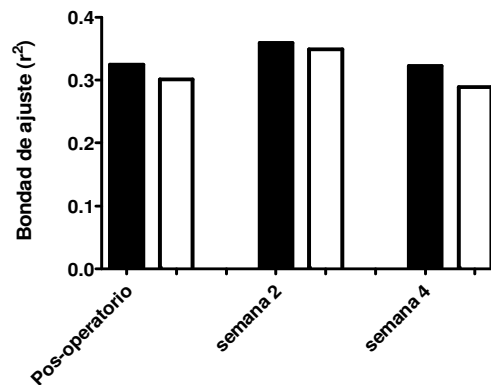
A diferencia de la prueba de escalera horizontal, la prueba del cilindro mostró que existe una diferencia significativa entre las curvas de tiempo de recuperación funcional cuando se compara los grupos infartados tratados con IDN5706 (n=8) con las ratas infartadas y tratadas solamente con vehículo (n=8) ( $P=0,048$ ). Además, presentaron diferencias significativas puntuales en la semana 2 y al término del tratamiento en la semana 4 (Fig. 8B). Estos datos en

su conjunto muestran que el tratamiento pos-infarto con la droga IDN5706 aumenta la recuperación funcional por un mecanismo que implica un aumento en la plasticidad neuronal.

7) A

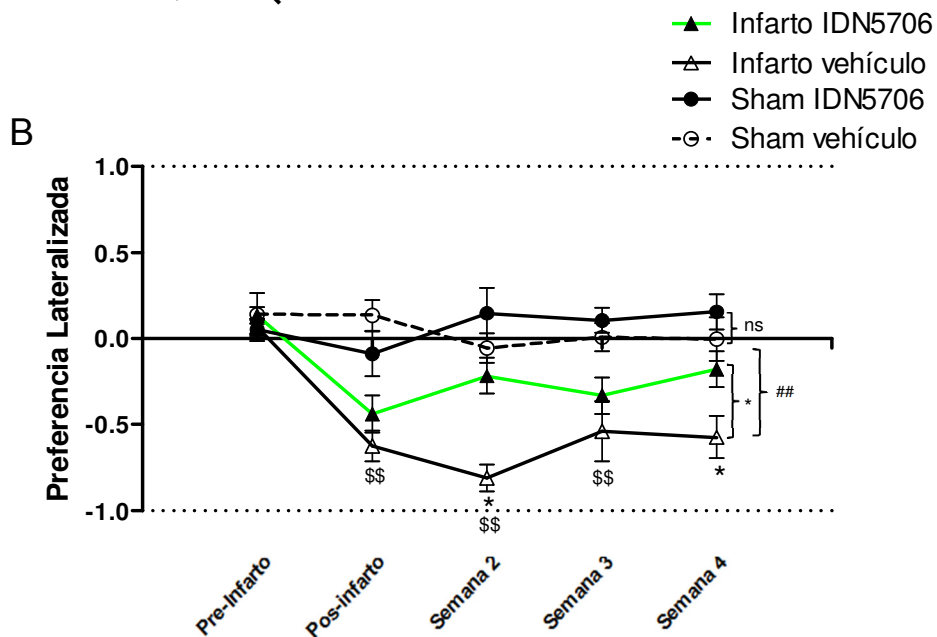
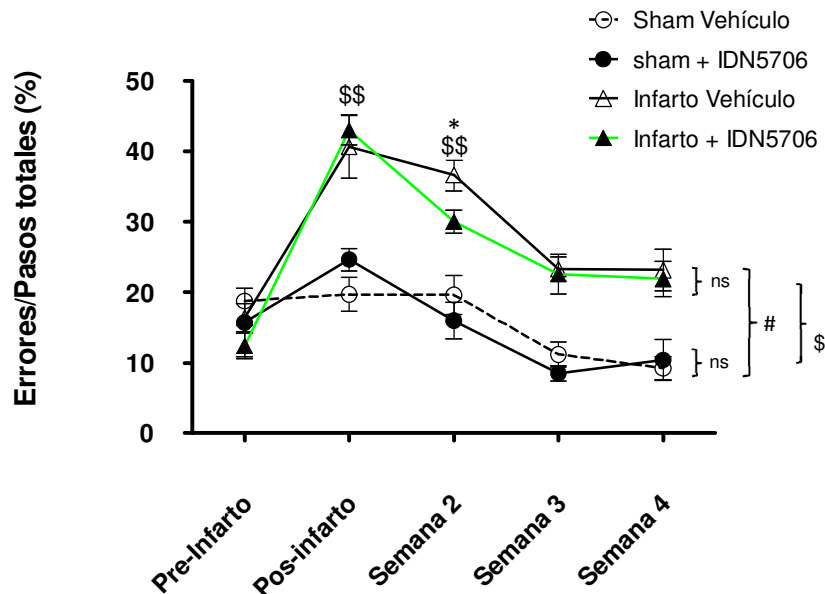


B



**Figura 7.** Efecto de venlafaxina en la correlación entre tamaños de infarto y rendimiento motor en escalera horizontal A) Gráfico de correlaciones entre rendimiento motor y tamaños de infarto. B) Gráfico de las bondades de ajuste ( $r^2$ ) de los grupos infarto salino e infarto venlafaxina a distintos tiempos: pos-operatorio (semana 1), semana 2 y semana 4.

8) A



**Figura8.** Efecto del análogo de hiperforina (IDN5706), sobre la recuperación funcional de ratas infartadas tratadas con vehículo (n=8), IDN5706 (n=8) versus sham IDN5706 (n=6) y sham vehículo (n=8). A. Prueba de escalera horizontal. Se indica la frecuencia de errores de la pata impedida en porcentaje. B. Prueba de balance en vara. Se muestra la frecuencia de los pasos exitosos (en porcentaje) sobre la barra. Tiempos de análisis: Pre-infarto, Pos-infarto, semana 2- 4. Estadística: ANOVA de 2 vías y bonferroni post test. (\*) Infarto IDN5706 vs Infarto vehículo. (#) Infarto Vehículo vs Sham vehículo y Sham IDN5706. (\$) Infarto IDN5706 vs Sham Vehículo y Sham IDN5706. \* p<0,05; \*\*p<0,01;\*\*\* p<0,001.

## **2. Efecto neuroprotector y/o neuroplástico de venlafaxina en un modelo de infarto cerebral focal en ratas.**

Cuando hay un daño en el cerebro, la astrogliía y la microglía censan el ambiente nocivo proliferando y aumentando tanto su tamaño como la expresión de marcadores específicos de estas células (Wang, Tang et al. 2007; Lakhan, Kirchgessner et al. 2009; Ceulemans, Zgavc et al. 2010). En el caso de los astrocitos cuando estos se hacen reactivos aumentan la expresión de la proteína glial fibrilar acídica o GFAP (por sigla en Inglés). La cuantificación de GFAP mediante el análisis de perfiles de escalas de grises (Fig. 9a-c), indican una disminución significativa de la astrogliosis en los cortes de cerebro de ratas tratadas con venlafaxina comparado con el tratamiento con vehículo (n=4). Tanto el grupo infartado como el tratado con venlafaxina presentan un incremento significativo de la marca de GFAP versus los grupos sham (n=4). Sin embargo, entre los 100  $\mu\text{m}$  y 600  $\mu\text{m}$  de distancia a la lesión, el tratamiento con venlafaxina presenta una significativa reducción de la intensidad de marca de GFAP comparado con el grupo tratado con vehículo (Fig. 9c). A medida que aumenta la distancia desde el sitio de la lesión, el tratamiento con venlafaxina alcanza niveles controles antes que el tratado con vehículo ( $p < 0,05$  para cada punto entre 100  $\mu\text{m}$  y 600  $\mu\text{m}$  alejados de la lesión).

La microglía reactiva fue marcada con el anticuerpo monoclonal OX42 que reconoce una integrina específica de este tipo celular (alfa-M/beta2). El análisis de la fluorescencia asociada al marcador indicó que el tratamiento con venlafaxina pos-infarto incrementó la extensión de la marca de OX42 en ratas infartadas tratadas con venlafaxina versus vehículo. Específicamente, se observó que venlafaxina aumentó significativamente los niveles de OX42 a distancias entre los 200 $\mu\text{m}$  y 300 $\mu\text{m}$  desde el punto de medición disminuyendo a niveles no significativos entre sí a mayores distancias de la lesión (Fig. 10).

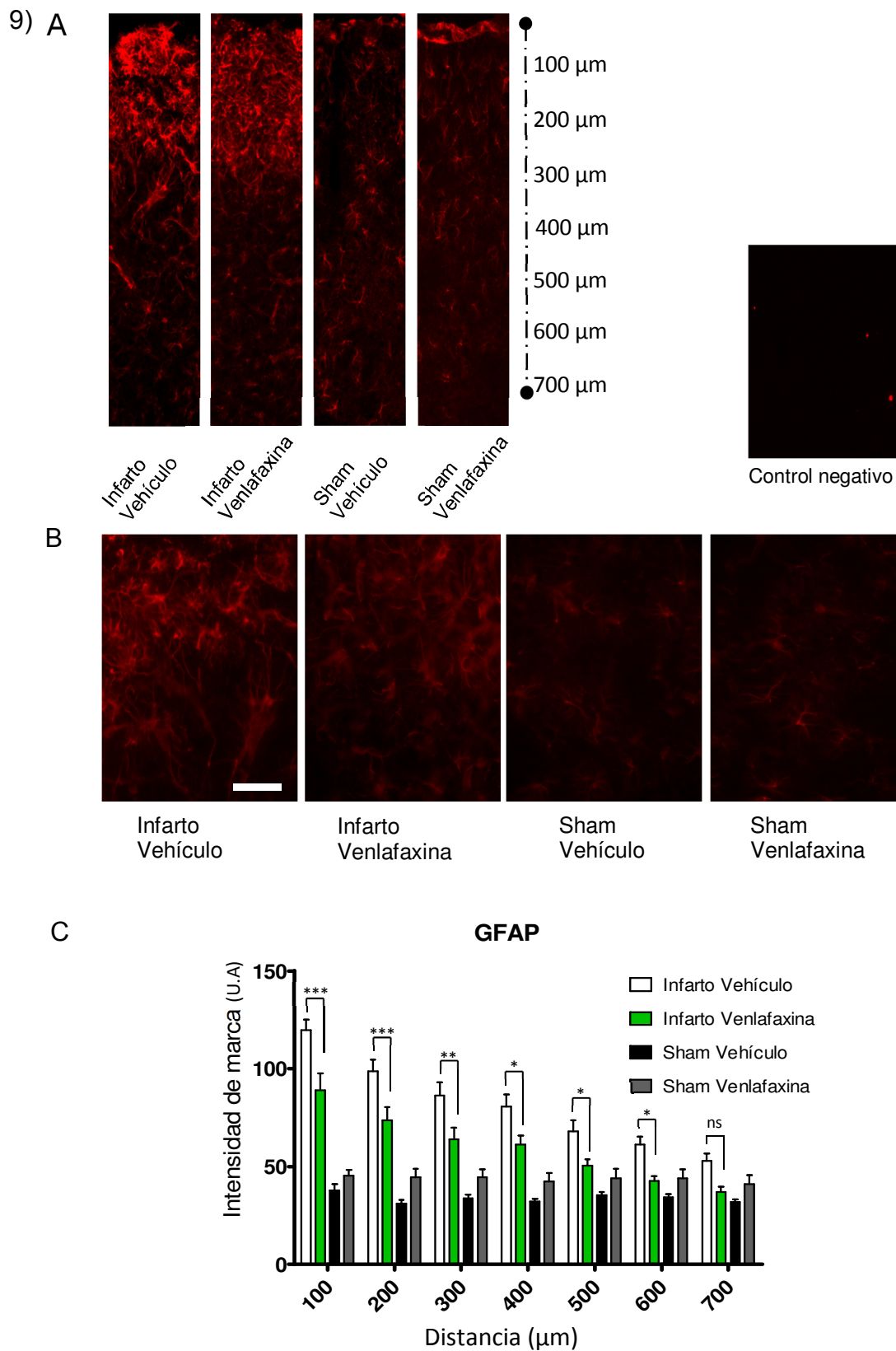


Figura 9. Inmunofluorescencia anti-GFAP. A) secciones de microfotografías 10X representativas de cada grupo. B) Microfotografías 40X representativas. C) Cuantificación de La intensidad de marca agregada en intervalos de 100 $\mu\text{m}$  para cada grupo. n=4, 3 cortes por rata.

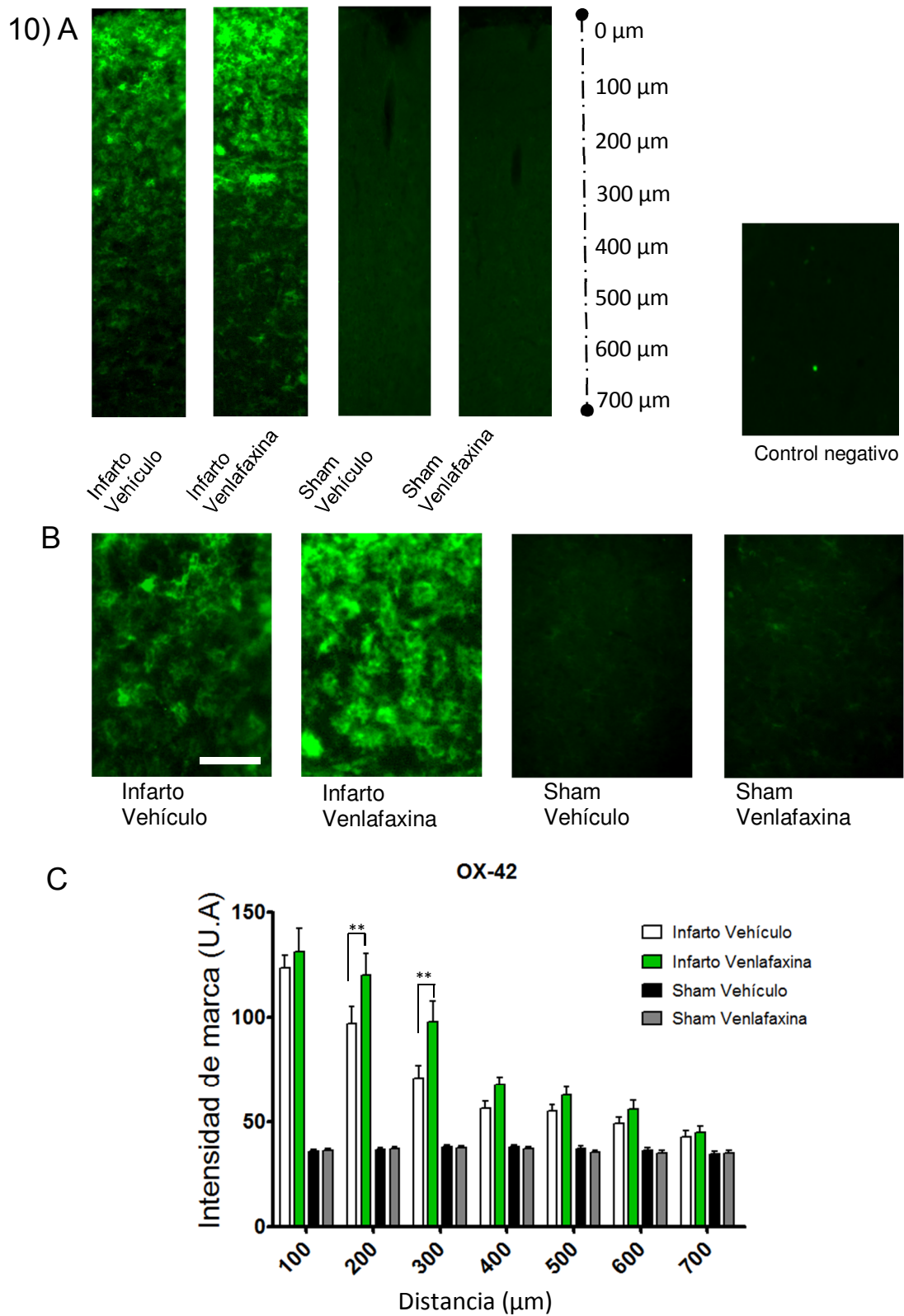


Figura 10. Inmunofluorescencia anti-OX42. A) secciones de microfotografías 10X representativas de cada grupo. B) Microfotografías 40X representativas (barra = 60μm). C) Cuantificación de La intensidad de marca agregada en intervalos de 100μm para cada grupo. n=4, 3 cortes por rata.

La proteína asociada a microtúbulos 2 o MAP2 (por su sigla en inglés) es una proteína que se expresa exclusivamente en el soma y en el árbol dendrítico de las neuronas y puede ser usado como un marcador de integridad neuronal. La comparación cuantitativa de la tinción de MAP2 en cerebros infartados y tratados con venlafaxina comparado con cortes de ratas infartadas y tratadas con vehículo mostraron un aumento significativo en la intensidad de la marca entre los 200µm y 500µm de la lesión (Fig. 11), (\*\*P<0,001), además se observa un aumento de en el tratamiento con venlafaxina del grupo infartado comparado con el grupo sham vehículo (\*\*P<0,01). Los grupos infartados presentan valores con diferencias no significativas entre sí ni tampoco con los grupos sham hacia el final de la medición (700 µm) (Fig. 11 y 12).

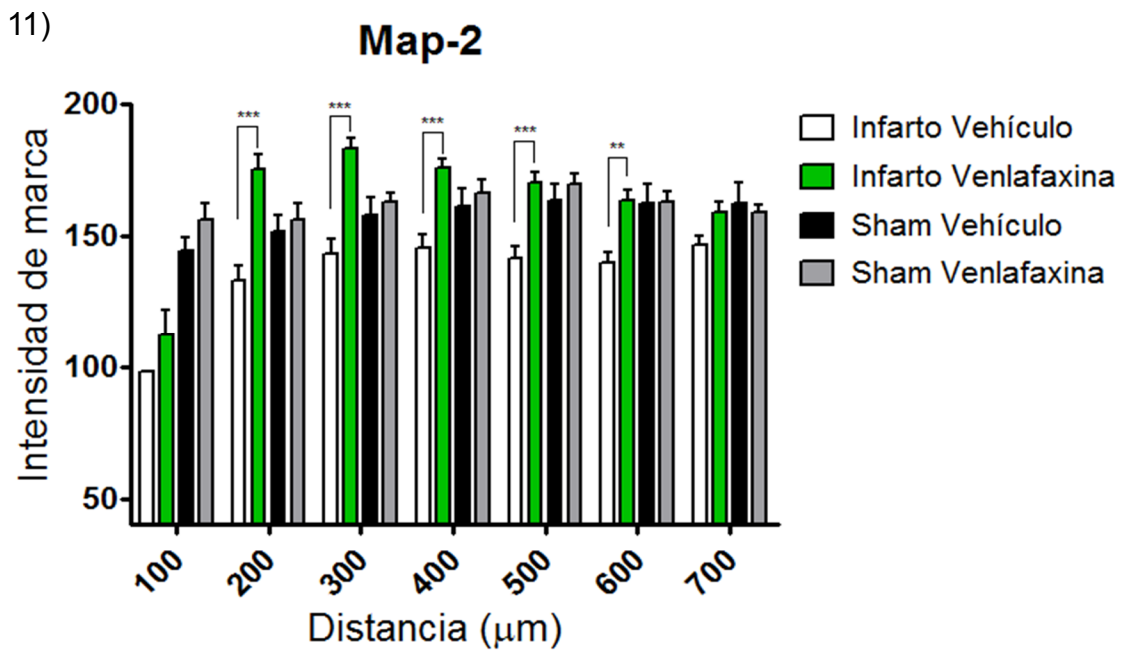
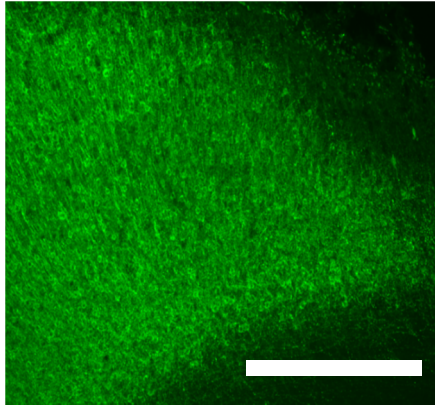


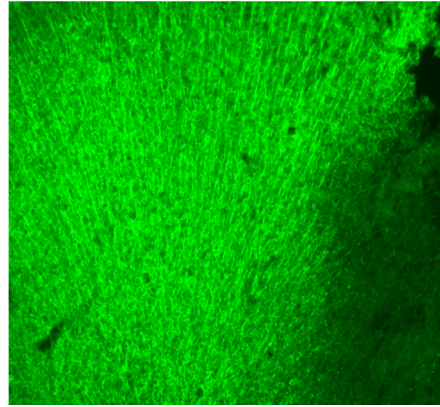
Figura 11. Cuantificación de la intensidad de marca agregada de MAP-2 en intervalos de 100µm para cada grupo. n=4, 3 cortes por rata.

12)

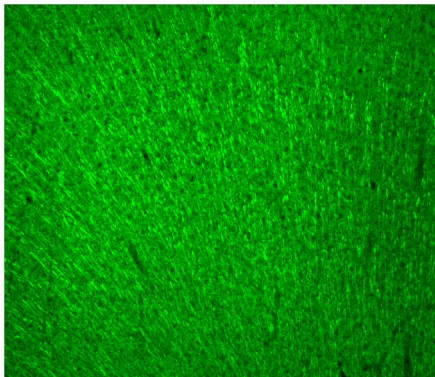
Infarto vehículo



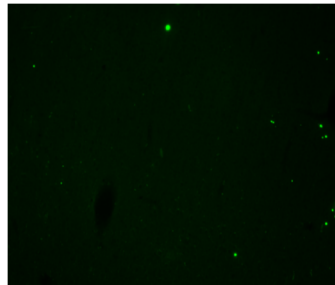
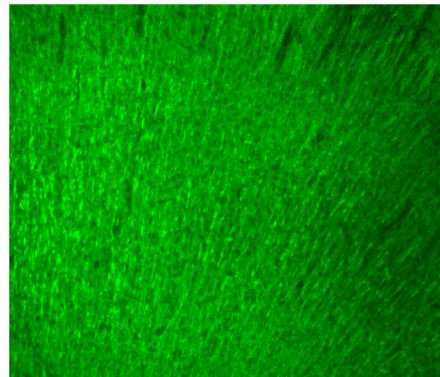
Infarto venlafaxina



Sham vehículo



Sham venlafaxina



Control negativo

Figura 12 .Inmunofluorescencia MAP-2. Microfotografías 10X. Barra = 400µm.

El compartimento somatodendrítico recibe los contactos sinápticos proveniente de aferencias de regiones cerebrales adyacentes y distantes. Dado que nuestros datos indican que venlafaxina en cerebros infartados aumenta la expresión de MAP2 procedimos a investigar si existen diferencias en la expresión de un marcador pre-sináptico como sinaptofisina y un marcador pos-sináptico como la PSD95. Primero se realizó una triple inmunofluorescencia de sinaptofisina, PSD95 y Neurotrace, la marca mostró una distribución de los marcadores pre y pos-sinápticos en la vecindad del soma neuronal (Fig. 13). Venlafaxina, no alteró la expresión de PSD95 en el grupo infartado tratado con el neuromodulador comparado con el grupo infartado tratado con vehículo (Fig. 14a). Sin embargo, se observó que el grupo infartado tratado con venlafaxina, la marca para sinaptofisina fue significativamente mayor comparado con el grupo infartado tratado con vehículo (\*\* $P < 0,01$ ) (Fig 14b). Finalmente se analizó por inmunohistoquímica la expresión de la proteína asociada a conos de crecimiento 43 o GAP43 (por su sigla en inglés). Esta proteína es un marcador de plasticidad neuronal al estar presente en brotes axonales o dendríticos. El análisis de la tinción específica asociada a GAP43 (Fig.15), reveló un aumento de la marca en los grupos infartados versus los grupos sham (### $P < 0,001$ ) y un aumento del grupo infartado tratado con venlafaxina versus el infarto vehículo (\*\* $P < 0,01$ ). Todos estos datos en su conjunto indican que venlafaxina administrada pos infarto tiene efectos significativos en los distintos tipos celulares cerebrales, específicamente astrogliá, microglía y neuronas. Los efectos del venlafaxina son por lo tanto, pleiotrópicos los que hace difícil proponer mecanismos celulares y moleculares específicos asociados a este fármaco. Sin embargo, podemos proponer que los efectos de este fármaco en un cerebro infartado producen efectos tanto neuroprotectores (al modular a la astrogliá y microglía), como neuroplásticos aumentando la recuperación funcional en forma temprana.

13)

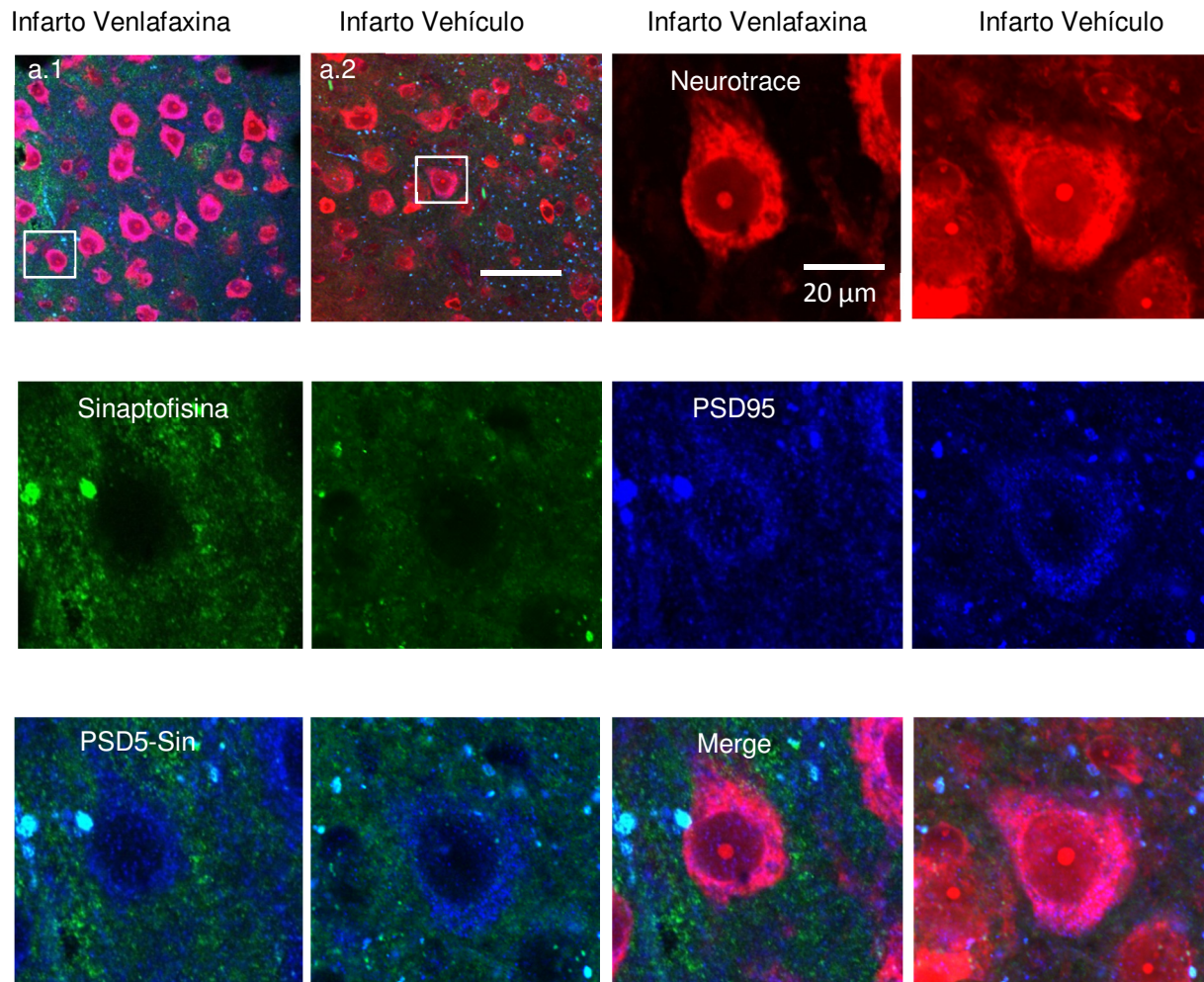
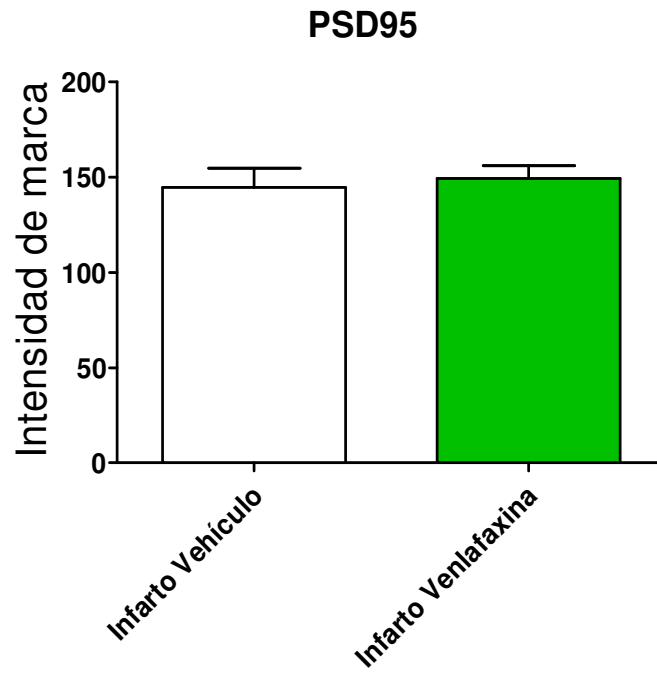


Figura 13. Inmunofluorescencia contra PSD95 (azul), Sinaptofisina (verde) y tinción neurotrace (rojo) en un corte de cerebro infartado tratado con vehículo comparado con venlafaxina en la región de la penumbra. Los recuadros en las figuras de arriba a la izquierda son aumentos 4X de la imagen 60X.

14) A



B

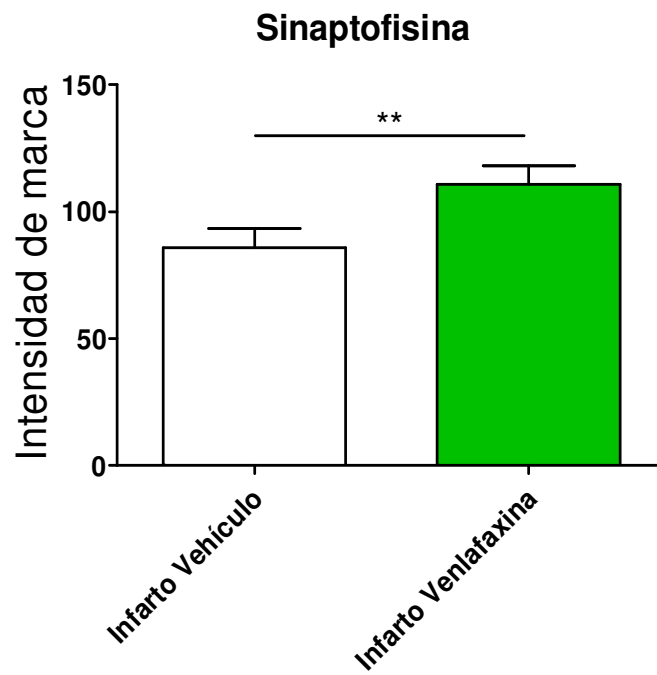


Figura 14. Cuantificación de la intensidad de marca entre los grupos infarto venlafaxina e infarto vehículo grupo. A) Cuantificación de PSD95 y B) Cuantificación de sinaptofisina. n=4, 3 cortes por rata.

15) A

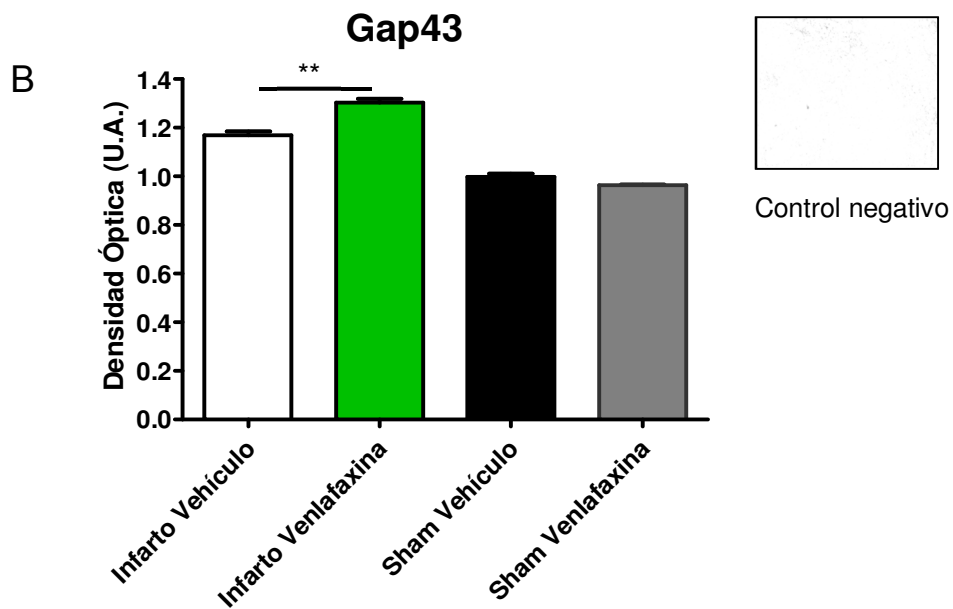
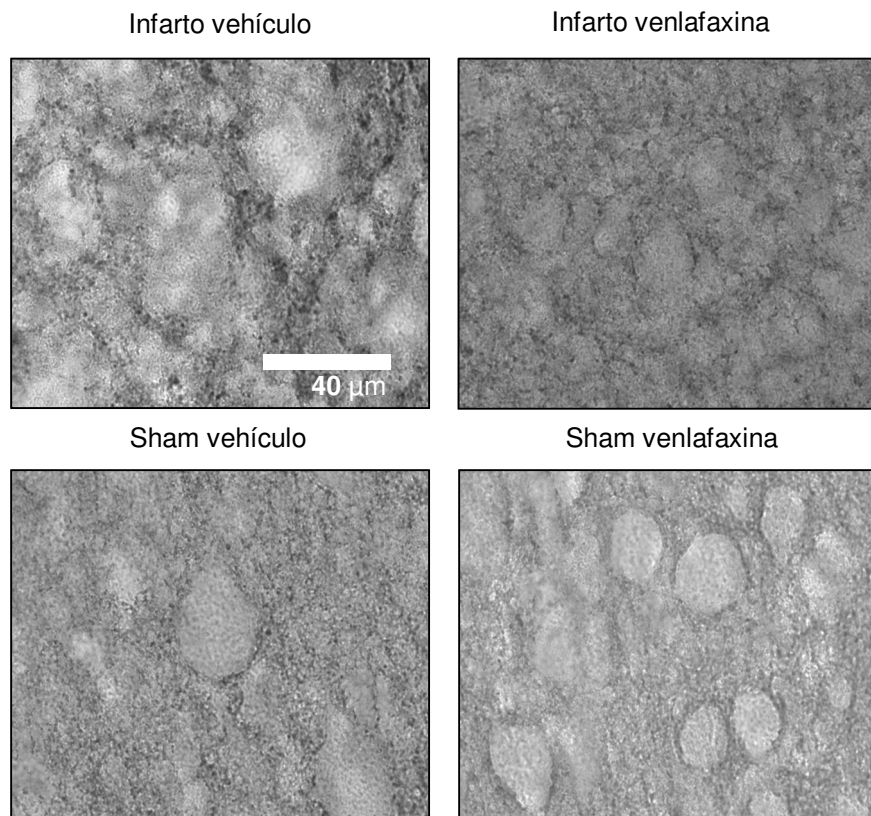


Figura 15. Inmunohistoquímica anti-GAP-43. A) Microfotografías 100X. B) Cuantificación de la densidad de marca para GAP43. \*\* $P < 0,01$ ;  $n = 4$ , 3 cortes por rata.

## DISCUSIÓN

En esta tesis nos propusimos el objetivo de evaluar el efecto de dos antidepresivos uno de origen sintético y otro de origen natural sobre la recuperación funcional motora en un modelo de infarto cerebral focal en rata. Nuestra hipótesis es que estos antidepresivos, al aumentar la capacidad trófica del cerebro, podrían conferir neuroprotección y/o neuroplasticidad al cerebro dañado. Nuestros datos apoyan nuestra hipótesis dado que ambos antidepresivos lograron aumentar la recuperación funcional en algún test motor aunque por diferentes mecanismos. Estos hallazgos serán discutidos a continuación.

### **Selección del modelo y estrategia experimental.**

Uno de los modelos animales más utilizados para inducir infarto cerebral es el modelo de oclusión de la MCAo por sutura intraluminal. Sin embargo, presenta varias desventajas. Primero, define una región de daño que incluye la neocorteza y el cuerpo estriado lateral, con tamaños de tejido infartado altamente variable, haciéndolo un método poco reproducible conductualmente (Kleim, Boychuk et al. 2007). Segundo, el modelo de isquemia-reperfusión realizado por MCAo transitorio, produce una reperusión inmediata del flujo de sangre, lo que no es fisiológicamente representativo de un infarto cerebral (Carmichael 2005).

Nosotros elegimos el modelo de inducción de infarto por inyección intracortical de et-1, en la corteza motora primaria (M1) y en la corteza somatosensorial que controla las patas delanteras (S1FL), cuya principal ventaja es generar una deficiencia motriz significativa la cual es reproducible en ratas. Además, posee la ventaja de generar infartos cerebrales más acotados debido a que la oclusión ocurre en la microcirculación de las regiones seleccionadas (Tugwood and Montague 2002). Aunque existe variabilidad entre los tamaños de infarto, existe una deficiencia motora reproducible, ya que las zonas elegidas siempre son afectadas (Macrae,

Robinson et al. 1993; Gresham, Kelly-Hayes et al. 1998). Además, produce una oclusión rápida pero no inmediata del flujo sanguíneo, y la re perfusión puede durar varias horas ocurriendo paulatinamente, resultando así, ser un método más representativo de un infarto cerebral humano (Macrae, Robinson et al. 1993; Gresham, Kelly-Hayes et al. 1998).

### **Venlafaxina e IDN5706 aumentan la recuperación funcional luego de un infarto cerebral focal.**

Nuestros análisis mostraron que la venlafaxina, logró disminuir significativamente los volúmenes de infarto y los errores/paso en la escalera horizontal desde el día pos-operatorio (día 3), lo cual sugiere un efecto predominantemente neuroprotector del neuromodulador, posiblemente mediante mecanismos anti-inflamatorios de forma similar a los procesos de incremento en el rendimiento motor en estudios de recuperación funcional con fluoxetina en ratas infartadas en un modelo de MCAo (Lim, Kim et al. 2009), venlafaxina si bien no presenta diferencias significativas entre las curvas de números de pasos exitosos de los grupos infarto-vehículo e infarto venlafaxina en la prueba de la vara, si presenta diferencias terminado el estudio sugiriendo un posible efecto neuroplástico del neuromodulador.

Un resultado interesante, con respecto a la relación que existe entre tamaño de infarto y recuperación funcional. Es que al hacer un análisis de correlación entre el tamaño del infarto y el desempeño motor no existe correlación alguna entre ambos parámetros. Una explicación para aquello, es que el núcleo de la lesión no esté situado en todos los individuos infartados en la misma zona de la corteza motora pudiendo quedar áreas de esta zona del cerebro sin morir o con una penumbra de mayor tamaño, y que tiene más probabilidad de ser rescatada con el neuromodulador. Por otro lado, un infarto pequeño que está situado justo en la corteza motora primaria, podría inducir un déficit motor que es equivalente a un infarto más extenso, pero que no tomó toda la M1. Esto puede explicar cómo infartos de mayor tamaño tienen mejor rendimiento motor que ratas con tamaños de infarto menor y viceversa.

Por otro lado, el efecto del análogo de hiperforina, IDN5706, aunque no tuvo efecto en el tamaño del infarto, logró aumentar la recuperación funcional en la prueba de la escalera horizontal, en las dos semanas pos-operatorias (Fig.8a). La existencia de procesos que conllevan a la recuperación funcional se ve reforzada con la prueba del cilindro, donde la curva de recuperación funcional de ratas infartadas y tratadas con hiperforina es significativamente de las tratadas con vehículo cuya significancia es aún mayor en las semanas 2 y 4 llegando a valores controles (Fig. 8b). Estudios previos realizados con hiperforina, han mostrado un aumento en tareas aprendizaje y consolidación de la memoria por efecto del neuromodulador (Klusa V 2001) y previene el deterioro del rendimiento motor en modelos de Alzheimer en rata (Dinamarca, Cerpa et al. 2006). En ese mismo modelo de Alzheimer, IDN5706 aumenta la memoria espacial en ratas silvestres y previene el deterioro cognitivo y de marcadores de neuroplasticidad en ratas que desarrollan la enfermedad (Inestrosa, Tapia-Rojas et al. 2011). Nuestros resultados indican que el efecto de este fármaco podría estar mediado principalmente por mecanismos inductores de neuroplasticidad comparable con el efecto de venlafaxina.

#### **Evaluación del efecto neuroprotector y/o neuroplástico de venlafaxina en un modelo de infarto cerebral focal en ratas usando diferentes marcadores celulares.**

El tratamiento con venlafaxina 3 horas después de inducido el daño isquémico, demostró ser eficaz en disminuir la intensidad del marcador de astrocitos GFAP (Fig.9) y en aumentar la reactividad de la microglía (Fig.10). Estos resultados indican un efecto neuroprotector de venlafaxina que sugieren un aumento de factores antiinflamatorios expresados en la zona del infarto. La microglía activada (Fig.10) si bien se cree que está asociada a procesos neurotóxicos debido a evidencias en modelos de *in vitro*, se ha observado *in vivo* que la microglía puede jugar un rol fundamental en procesos de neuroprotección contra daño neuronal e isquemia cerebral (Kitamura, Yanagisawa et al. 2009). La activación de astrogliá y microglía, y el deterioro morfológico celular en la zona adyacente a la inyección de vehículo en animales control, se presenta en un nivel muy inferior al de los cortes de animales infartados, puesto que la acción mecánica de la aguja resulta en una cantidad mínima o nula de neuronas dañadas.

Estudios realizados sobre un modelo de oclusión de la MCA en rata con fluoxetina, que comparte con venlafaxina el mecanismo de acción de recaptura de serotonina, muestran un efecto neuroprotector, el cual se explica en parte por una inhibición del factor de transcripción Nf- $\kappa$ B y así, de una inhibición de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , interleuquina-1 $\beta$  interleuquina-6 (Wang, Tang et al. 2007). Sin embargo aún no hay evidencia de la vía de señalización activada por estos antidepresivos que lleven a la inhibición de Nf- $\kappa$ B.

Por otra parte, existen factores anti-inflamatorios cuya expresión confiere neuroprotección, como es el caso del factor transformante de crecimiento beta (TGF $\beta$ ). Una de la respuesta inflamatoria cerebral, pos infarto en modelos de MCAo, es el aumento en la expresión de TGF $\beta$  1 y 2 expresado en astrocitos y microglía (Ata, Lennmyr et al. 1999; Wu, Hayashi et al. 2007). Estudios hechos en nuestro laboratorio, indican que a pesar de que venlafaxina no aumenta significativamente la expresión de TGF $\beta$ 1, este pueda mostrar variaciones significativas cuando se aumente el número de individuos en cada grupo ya que las diferencias marcan una clara tendencia al aumento ( $p=0,057$ ) (Fig.16).

Otra posibilidad a considerar, es que dado que venlafaxina, en dosis altas (20 mg\*kg/rata) administradas diariamente durante 5 semanas, aumenta los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Czubak A 2009) y de que existen evidencias del rol neuroprotector de BDNF en modelos de infarto cerebral (Endres, Fan et al. 2000; Ploughman, Windle et al. 2009). En nuestro laboratorio, hemos encontrado que venlafaxina, si bien no aumenta significativamente los niveles de expresión de BDNF mediante RT-PCR en la corteza motora de rata contralateral a la lesión es posible que esta diferencia sea significativa al aumentar el número de animales para cada tratamiento lo que esperamos reduzca la gran dispersión de los valores de expresión de BDNF en el grupo tratado con venlafaxina ( $p=0,056$ ) (Fig.17).

Por otra parte, se ha observado, que hiperforina estimula la expresión de los canales TRPC6, el receptor TrkB y fosfo-TrkB in vitro y la expresión de TrkB en corteza en ratón (Gibon, Deloulme et al. 2013).

Después del infarto cerebral ocurren alteraciones de la expresión y función de diversos elementos que participan en procesos de plasticidad neuronal inducida por el daño isquémico. La muerte masiva de neuronas, genera regiones denervadas que servirán de estímulo para el surgimiento de brotes axonales, re-modelamiento dendrítico y el establecimiento de nuevas conexiones sinápticas (Dancause 2005). En nuestro estudio, hemos encontrado un aumento significativo de la expresión de GAP43 en ratas infartadas comparado con ratas sham. A su vez, venlafaxina, incrementa aún más la expresión de GAP43 versus ratas infartadas tratadas con vehículo (Fig.11), asociado a esto, se observa un incremento en la expresión de sinaptofisina en las ratas infartadas tratadas con venlafaxina versus vehículo (Fig.14b). Estos datos sugieren que están ocurriendo fenómenos plásticos de remodelamiento axonal a nivel presináptico.

Existe evidencia de que el uso de antidepresivos ISRS tales como fluoxetina en ratón (Mogha, Guariglia et al. 2012) y citalopram en rata (Tomasetti, Dell'Aversano et al. 2011), aumentan la expresión de genes de la densidad post-sináptica. Contrario a lo esperado, PSD95, no ve alterada su expresión en el grupo infartado tratado con venlafaxina (Fig. 14a). Esto puede deberse a que el tratamiento con venlafaxina requeriría de más tiempo para ejercer tal efecto o a que el incremento de la actividad noradrenérgica y/o dopaminérgica puede estar afectando la expresión de PSD95.

### **Posibles mecanismos de recuperación funcional inducido por venlafaxina e IDN5706**

Venlafaxina y el análogo de hiperforina IDN5706 elevan las concentraciones de monoaminas en el espacio sináptico mediante diferentes mecanismos de acción: venlafaxina, es un inhibidor competitivo de los transportadores de monoaminas, inhibiendo selectivamente los transportadores de serotonina en dosis bajas (75mg\*dosis en humanos; 3mg\*kg en rata), noradrenalina y dopamina en dosis elevadas (375mg\*dosis en humanos y 30 mg\*kg en rata)

(Dawson, Nguyen et al. 1999; Harvey et al. 2000), Hiperforina por su parte, se liga a los receptores TRPC6 alterando alostéricamente las gradientes de concentración de  $\text{Ca}^{+}$  y  $\text{Na}^{+}$ , de las cuales dependen los transportadores de monoaminas para la recaptura de los neurotransmisores (Singer, Wonnemann et al. 1999; Leuner, Kazanski et al. 2007). Por otra parte, mediante estudios autorradiográficos en modelos fototrombóticos de infarto cerebral en rata, se ha observado una disminución en la expresión de distintos receptores monoaminérgicos: los serotoninérgicos 5HT<sub>2a</sub>, b y c, los noradrenérgicos  $\beta_1$ R y dopaminérgicos D<sub>1</sub>R los cuales se recuperan a niveles controles al cabo de 4 semanas pos-operatorias (Rogozinska and Skangiel-Kramaska 2010).

Por lo tanto, los neuromoduladores podrían aumentar la actividad de los receptores monoaminérgicos remanentes durante los primeros días de ocurrido el infarto cerebral promoviendo procesos de señalización celular relacionados con el aumento de factores neuroprotectores, en el caso de venlafaxina, los cuales pueden disminuir las secuelas del infarto cerebral y el aumento de factores inductores de la neuroplasticidad, en el caso de venlafaxina e IDN5706, acelerando el proceso de aumento del rendimiento motor.

El incremento de la actividad de receptores 5-HT, están relacionados con una inducción de factores neuroprotectores al disminuir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y al aumentar la expresión del gen antiapoptótico BCL-2 y disminuir la activación de la microglía en modelos de infarto cerebral por MCAo en ratón (Capone, Fabrizi et al. 2006).

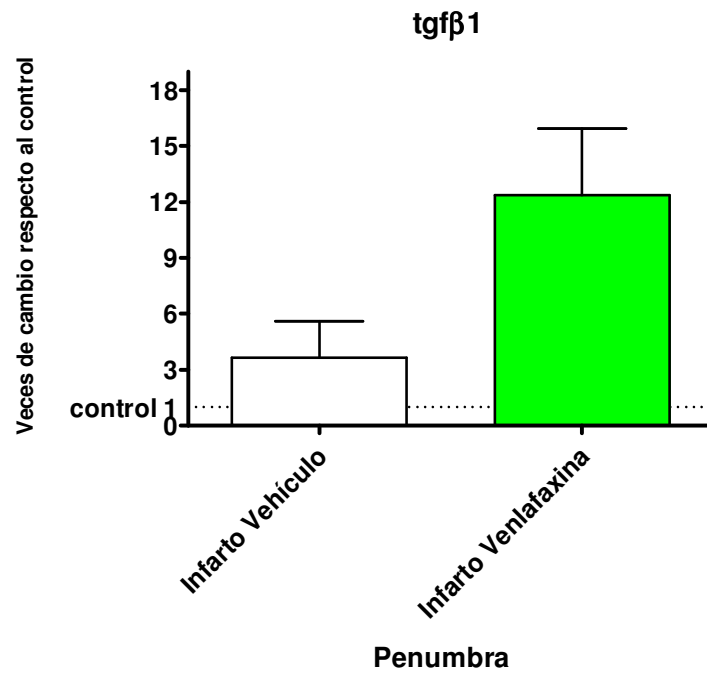
Agonistas del receptor D1 de dopamina, inducen un efecto neuroprotector inhibiendo la generación de radicales libres mediante un mecanismo dependiente de la vía de señalización PI3K/Akt, resultando en una inhibición de iNOS (Yu, Wang et al. 2008)

La estimulación farmacológica de  $\beta$ -adrenoreceptores,  $\beta_1$ R y  $\beta_2$ R astrogliales con clenbuterol, resulta en una disminución de los tamaños de infarto, asociado a una disminución de la citotoxicidad mediada por glutamato en modelos de isquemia por MCAo permanente en

ratón (Junker, Becker et al. 2002), posee efectos anti-inflamatorios al disminuir la expresión de IL-1 $\beta$ , inhibe la iNOS y aumenta las neurotrofina BDNF y NGF en modelos de neurodegeneración inducido por kainato (Gleeson, Ryan et al. 2010). El incremento en la síntesis de BDNF, está mediada por la activación de los receptores 5-HT<sub>2a</sub> el cual activa la vía de señalización de la PLC y PKC (Meller, Babity et al. 2002). Se han propuesto modelos de facilitación a largo plazo inducido por hipoxia intermitente en los cuales se libera serotonina desde las neuronas del núcleo del rafe y la síntesis proteica mediada por receptores 5-HT<sub>2a</sub> (Mahamed and Mitchell 2007)

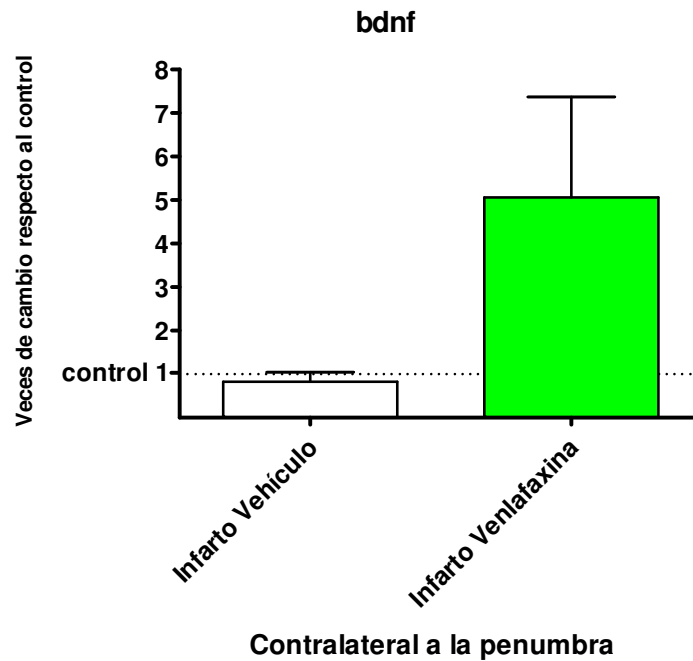
Estudios en rebanadas de cerebro de rata y de cultivo en células PC12, han entregado evidencia sobre la existencia de complejos heterodiméricos de receptores de serotonina 5-HT<sub>1a</sub> y FGFR1 en neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (Borroto-Escuela, Romero-Fernandez et al. 2012a), los cuales al ser coactivados con agonistas de serotonina y FGF2 aumentan sinérgicamente la activación de la vía de señalización mediada por ERK 1 y 2 (Borroto-Escuela, Romero-Fernandez et al. 2012b). En nuestro laboratorio, hemos visto que venlafaxina, aumenta significativamente los niveles del mensajero de FGF2 (Fig. 18), lo cual posiblemente significaría un aumento en los niveles del ligando FGF2 aumentando sinérgicamente junto a la actividad de serotonina, procesos neuroplásticos tales como el crecimiento de neuritas y del árbol dendrítico.

16)



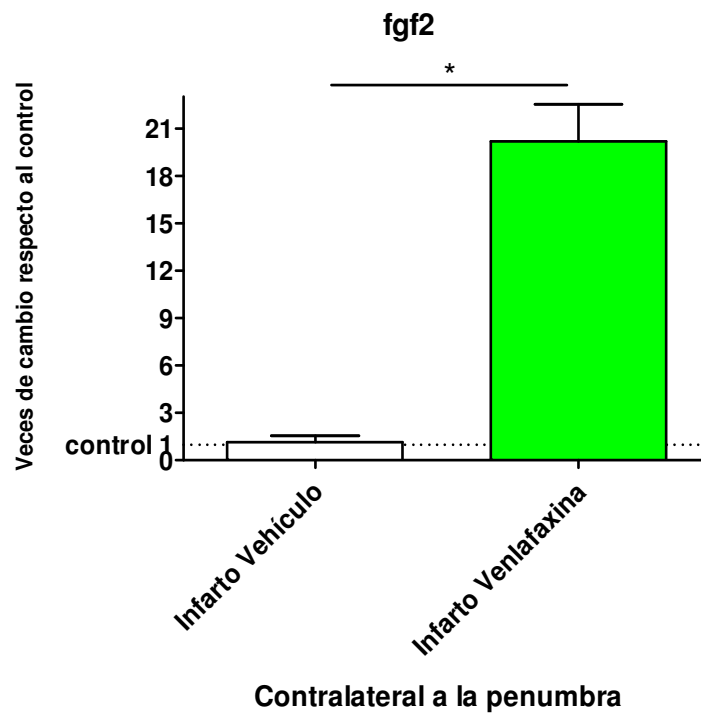
**Figura 16.** Cuantificación de la expresión de mRNA de tgf $\beta$ 1 mediante RT-PCR. Infarto salino (n=4), Infarto Venlafaxina (n=3). P=0,057.

17)



**Figura 17.** Cuantificación de la expresión de mRNA de bdnf mediante RT-PCR. Infarto salino (n=4), Infarto Venlafaxina (n=4). p=0,056

18)



**Figura 18.** Cuantificación de la expresión de mRNA de fgf2f mediante RT-PCR. Infarto salino (n=4), Infarto Venlafaxina (n=4). p=0,029

## CONCLUSIONES

El tratamiento crónico con los neuromoduladores venlafaxina e IDN5706 logró incrementar el rendimiento motor en ratas infartadas mediante inyección intracortical de et-1 acelerando los procesos de recuperación funcional.

La administración de venlafaxina utilizando una dosis inicial de 30mg/kg y dosis crónicas de 15 mg/kg\*día, logró disminuir significativamente los tamaños de infarto. Asociado a esto, se observó una disminución del marcador de astrogliá reactiva GFAP y a un aumento en la marca microglial, indicando la existencia de procesos de neuroprotección que atenúan los efectos del infarto cerebral.

Venlafaxina, modula procesos neuroplásticos alterando la expresión de sinaptofisina cuyos valores son superiores en ratas infartadas tratadas con el fármaco versus vehículo, ya sea por un aumento de la expresión o por prevención de la disminución del marcador. Estos cambios de expresión, están relacionados también con el incremento de la expresión marcador de plasticidad neuronal GAP43 y en el marcador de integridad neuronal somatodendrítico MAP2. Además, no afecta la expresión de PSD95 por lo que venlafaxina estaría actuando a nivel de marcadores pre-sinápticos de plasticidad.

Estos resultados permiten concluir que venlafaxina ejerce un efecto neuroprotector y neuroplástico los cuales podrían ser la causa del incremento en la recuperación funcional observada

El tratamiento con el análogo de hiperforina IDN5706 en dosis de 6mg/kg\*rata, aunque no induce una disminución en los tamaños de infarto en las ratas infartadas, no se puede concluir que el neuromodulador esté actuando sobre algún elemento neuroprotector y/o

neuroplástico que dé cuenta de la recuperación funcional existente. A futuro, es necesario realizar experimentos que den evidencias de aquello.

Finalmente, se puede concluir que ambos fármacos son agentes con un gran potencial como tratamiento clínico favorable contra el infarto cerebral en humanos, siendo venlafaxina el candidato de mejor pronóstico a corto plazo. Esto, porque venlafaxina es un fármaco ya testeado con seguridad en el tratamiento de la depresión mayor en humanos y el cual se distribuye actualmente en el comercio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. I., P. N. Yadav, et al. (2009). "PSD-95 Is Essential for Hallucinogen and Atypical Antipsychotic Drug Actions at Serotonin Receptors." The Journal of Neuroscience **29**(22): 7124-7136.
- Adams HP Jr, B. T., Furlan AJ, Gomez CR, Grotta J, Helgason CM, Kwiatkowski T, Lyden PD, Marler JR, Torner J, Feinberg W, Mayberg M, Thies W (1996). "Guidelines for thrombolytic therapy for acute stroke: a supplement to the guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council." American Heart Association **94**: 1167–1174.
- Aigner, L. and P. Caroni (1993). "Depletion of 43-kD growth-associated protein in primary sensory neurons leads to diminished formation and spreading of growth cones." The Journal of Cell Biology **123**(2): 417-429.
- Asnes, C. F., J. P. Marquez, et al. (2006). "Reconstitution of the Frank-Starling Mechanism in Engineered Heart Tissues." Biophysical Journal **91**(5): 1800-1810.
- Ata, K. A., F. Lennmyr, et al. (1999). "Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery." Acta Neuropathologica **97**(5): 447-455.
- Benowitz, L. I. and A. Routtenberg (1997). "GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity." Trends in Neurosciences **20**(2): 84-91.
- Biernaskie, J. and D. Corbett (2001). "Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury." J. Neurosci. **21**: 5272-5280.
- Biernaskie, J., G. Chernenko, et al. (2004). "Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury." J. Neurosci. **24**: 1245-1254.
- Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, et al. (2012b). "Fibroblast Growth Factor Receptor 1– 5-Hydroxytryptamine 1A Heteroreceptor Complexes and Their Enhancement of Hippocampal Plasticity." Biological psychiatry **71**(1): 84-91.
- Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, et al. (2012a). "The Existence of FGFR1–5-HT1A Receptor Heterocomplexes in Midbrain 5-HT Neurons of the Rat: Relevance for Neuroplasticity." The Journal of Neuroscience **32**(18): 6295-6303.
- Bronfman, F. C. and M. Fainzilber (2004). "Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out?" EMBO reports. **5**(9): 867-871.
- Brown, C. E., K. Aminoltejari, et al. (2009). "In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites." J. Neurosci. **29**: 1719-1734.
- Buchkremer-Ratzmann, I., M. August, et al. (1996). "Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain." Stroke **27**: 1105-1109.

- Caccia S, G. M. (2009). "St. John's wort components and the brain: uptake, concentrations reached and the mechanisms underlying pharmacological effects." Curr Drug Metab. **10**(9): 1055-1065.
- Candelario-Jalil (2009). "Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics." Curr Opin Investig Drugs **10**(7): 644-654.
- Capone, C., C. Fabrizi, et al. (2006). "2-Aminotetraline Derivative Protects from Ischemia//Reperfusion Brain Injury with a Broad Therapeutic Window." Neuropsychopharmacology **32**(6): 1302-1311.
- Caprini, M., A. Gomis, et al. (2003). "GAP43 stimulates inositol trisphosphate-mediated calcium release in response to hypotonicity." EMBO J **22**(12): 3004-3014.
- Carmichael, S. T. (2003). "Plasticity of Cortical Projections after Stroke." The Neuroscientist **9**(1): 64-75.
- Carmichael, S. T. (2005). "Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose." NeuroRx **2**: 396-409.
- Carmichael, S. T., I. Archibeque, et al. (2005). "Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex." Experimental Neurology **193**(2): 291-311.
- Carmichael, S. T. and M.-F. Chesselet (2002). "Synchronous Neuronal Activity Is a Signal for Axonal Sprouting after Cortical Lesions in the Adult." The Journal of Neuroscience **22**(14): 6062-6070.
- Ceulemans, A.-G., T. Zgavc, et al. (2010). "The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia." Journal of Neuroinflammation **7**(1): 74.
- Clarkson, A. N., J. J. Overman, et al. (2011). "AMPA Receptor-Induced Local Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Mediates Motor Recovery after Stroke." The Journal of Neuroscience **31**(10): 3766-3775.
- Cowen, D. S. (2007). "Serotonin and neuronal growth factors – a convergence of signaling pathways." Journal of Neurochemistry **101**(5): 1161-1171.
- Czubak A, N. E., Kus K, Burda K, Metelska J, Baer-Dubowska W, Cichocki M (2009). "Influences of chronic venlafaxine, olanzapine and nicotine on the hippocampal and cortical concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." Pharmacol Rep. **61**(6): 1017-1023.
- Chao, M. A. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nature reviews neuroscience. **4**: 299-309.
- Chavez, J. C., O. Hurko, et al. (2009). "Pharmacologic Interventions for Stroke: Looking Beyond the Thrombolysis Time Window Into the Penumbra With Biomarkers, Not a Stopwatch." Stroke **40**(10): e558-563.
- Chen, J., C. Zhang, et al. (2005). "Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice." J Cereb Blood Flow Metab **25**(2): 281-290.
- Dancause, N. (2005). "Extensive cortical rewiring after brain injury." J. Neurosci. **25**: 10167-10179.
- Dancause, N., S. Barbay, et al. (2005). "Extensive Cortical Rewiring after Brain Injury." The Journal of Neuroscience **25**(44): 10167-10179.
- Dawson, L. A., H. Q. Nguyen, et al. (1999). "Effects of venlafaxine on extracellular concentrations of 5-HT and noradrenaline in the rat frontal cortex: augmentation via 5-HT1A receptor antagonism." Neuropharmacology **38**(8): 1153-1163.

- Dinamarca, M. C., W. Cerpa, et al. (2006). "Hyperforin prevents [beta]-amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid-[beta]-deposits." Mol Psychiatry **11**(11): 1032-1048.
- Donnan, G. A., M. Fisher, et al. (2008). "Stroke." Lancet **371**(9624): 1612-1623.
- Endres, M., G. Fan, et al. (2000). "Ischemic Brain Damage in Mice After Selectively Modifying BDNF or NT4 Gene Expression." J Cereb Blood Flow Metab **20**(1): 139-144.
- Fang S, Y. B., Wang D, Bi X, Zhang Y, He J, Xu H, Yang Y, Kong J, Wu J, Li XM. (2008). "Chronic effects of venlafaxine on synaptophysin and neuronal cell adhesion molecule in the hippocampus of cerebral ischemic mice." Biochem Cell Biol. **88**(4): 655-663.
- Feigin, V. L., C. M. Lawes, et al. (2003). "Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century." Lancet Neurol **2**(1): 43-53.
- Fuxe, K., B. Bjelke, et al. (1997). "Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia." Neuroreport **8**(11): 2623-2629.
- Gervasoni N, A. J., Bondolfi G, Osiek C, Schwald M, Bertschy G, Karege F. (2005). "Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode." Neuropsychobiology. **54**(4): 234-238.
- Gibon, J., J.-C. Deloulme, et al. (2013). "The antidepressant hyperforin increases the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB in a tissue-specific manner." The International Journal of Neuropsychopharmacology **16**(01): 189-198.
- Gilmour, G., S. D. Iversen, et al. (2005). "Amphetamine promotes task-dependent recovery following focal cortical ischaemic lesions in the rat." Behavioural Brain Research **165**(1): 98-109.
- Gleeson, L. C., K. J. Ryan, et al. (2010). "The  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist clenbuterol elicits neuroprotective, anti-inflammatory and neurotrophic actions in the kainic acid model of excitotoxicity." Brain, Behavior, and Immunity **24**(8): 1354-1361.
- Graham, S. H. and J. Chen (2001). "Programmed Cell Death in Cerebral Ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **21**(2): 99-109.
- Gresham, G. E., M. Kelly-Hayes, et al. (1998). "Survival and functional status 20 or more years after first stroke: the Framingham Study." Stroke **29**(4): 793-797.
- Griffith TN, V.-N. L., Dinamarca MC, Inestrosa NC (2010). "Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy." Curr Med Chem. **17**(5): 391-406.
- Hankey, G. J. (2006). "Potential New Risk Factors for Ischemic Stroke: What Is Their Potential?" Stroke **37**(8): 2181-2188.
- Harvey At, R. R. L. P. S. H. (2000). "Evidence of the dual mechanisms of action of venlafaxine." Archives of General Psychiatry **57**(5): 503-509.
- Hossmann, K.-A. (2006). "Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke." Cellular and Molecular Neurobiology **26**(7): 1055-1081.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annual Reviews Neuroscience **24**: 677-736.
- INE, I. n. d. E. (2010). "Estadísticas Vitales , informe anual 2010." 541.
- Inestrosa, N. C., C. Tapia-Rojas, et al. (2011). "Tetrahydrohyperforin prevents cognitive deficit, A[beta] deposition, tau phosphorylation and synaptotoxicity in the APP<sup>swe</sup>/PSEN1[Delta]E9 model of Alzheimer's disease: a possible effect on APP processing." Transl Psychiatry **1**: e20.

- Jens Minnerup, W.-R. S. (2009). "Multifunctional actions of approved and candidate stroke drugs." Neurotherapeutics **6**(1): 43-52.
- Junker, V., A. Becker, et al. (2002). "Stimulation of  $\beta$ -adrenoceptors activates astrocytes and provides neuroprotection." Eur J Pharmacol **446**(1-3): 25-36.
- Kitamura, Y., D. Yanagisawa, et al. (2009). "Neuroprotective function in brain microglia." Current Anaesthesia & Critical Care **20**(3): 142-147.
- Kleim, J. A., J. A. Boychuk, et al. (2007). "Rat models of upper extremity impairment in stroke." ILAR J **48**(4): 374-384.
- Klusa V, G. S., Nöldner M, Chatterjee SS (2001). "Hypericum extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents." Pharmacopsychiatry: 61-69.
- Lakhan, S. E., A. Kirchgessner, et al. (2009). "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches." J Transl Med **7**: 97.
- Larsson, M. H., Göran; Amos M. SAKWE\*, Åke ENGSTRÖM\*, Anna-Stina HÖGLUND†, Erik LARSSON‡, Robert C. ROBINSON\*, Christian SUNDBERG\* and Lars RASK (2003). "Selective interaction of megalin with postsynaptic density-95 (PSD-95)-like membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins." Biochem. J **373**: 381-391.
- Lavados, P. M., A. J. Hennis, et al. (2007). "Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean." Lancet Neurol **6**(4): 362-372.
- Leuner, K., V. Kazanski, et al. (2007). "Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels." The FASEB Journal **21**(14): 4101-4111.
- Lim, C.-M., S.-W. Kim, et al. (2009). "Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect." Journal of Neuroscience Research **87**(4): 1037-1045.
- Linde K, M. C., Berner M, Egger M (2005). "St John's wort for depression." Cochrane Database Syst Rev **18**(2): CD000448.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic Cell Death in Brain Neurons." Physiological Reviews **79**(4): 1431-1568.
- Lu, P., H. Yang, et al. (2004). "Combinatorial Therapy with Neurotrophins and cAMP Promotes Axonal Regeneration beyond Sites of Spinal Cord Injury." The Journal of Neuroscience **24**(28): 6402-6409.
- Macrae, I. M., M. J. Robinson, et al. (1993). "Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences." J Cereb Blood Flow Metab **13**(2): 276-284.
- Magalhaes, A. C., H. Dunn, et al. (2012). "Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins." British Journal of Pharmacology **165**(6): 1717-1736.
- Mahamed, S. and G. S. Mitchell (2007). "Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea?" Experimental Physiology **92**(1): 27-37.
- Mehta, S. L., N. Manhas, et al. (2007). "Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics." Brain Res Rev **54**(1): 34-66.
- Meller, R., J. Babity, et al. (2002). "5-HT<sub>2A</sub> Receptor Activation Leads to Increased BDNF mRNA expression in C6 glioma cells." NeuroMolecular Medicine **1**(3): 197-205.

- Metz, G. A., I. Antonow-Schlorke, et al. (2005). "Motor improvements after focal cortical ischemia in adult rats are mediated by compensatory mechanisms." Behavioural Brain Research **162**(1): 71-82.
- Metz, G. A. and I. Q. Whishaw (2009). "The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application." J Vis Exp(28): e1204.
- Minsal, R. d. C., Ministerio de Salud (2007). "Guía Clínica Ataque Cerebrovascular Isquémico del Adulto."
- Mogha, A., S. R. Guariglia, et al. (2012). "Serotonin 1A receptor-mediated signaling through ERK and PKC[alpha] is essential for normal synaptogenesis in neonatal mouse hippocampus." Transl Psychiatry **2**: e66.
- Murphy, T. H. and D. Corbett (2009). "Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour." Nat Rev Neurosci **10**(12): 861-872.
- Murphy, T. H., P. Li, et al. (2008). "Two-Photon Imaging of Stroke Onset In Vivo Reveals That NMDA-Receptor Independent Ischemic Depolarization Is the Major Cause of Rapid Reversible Damage to Dendrites and Spines." The Journal of Neuroscience **28**(7): 1756-1772.
- Neumann-Haefelin, T., G. Hagemann, et al. (1995). "Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro." Neuroscience Letters **193**(2): 101-104.
- Neumann-Haefelin, T., J. F. Staiger, et al. (1998). "Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats." Neuroscience **87**(4): 871-879.
- NINDS, T. N. I. o. N. D. a. S. r.-P. S. S. G. (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke." N Engl J Med **333**: 1581-1587.
- OMS, O. M. d. I. S. (2004).
- Paxinos, W. (1997). "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Compact 3rd Edition." Academic Press, Inc., San Diego.
- Ploughman, M., Z. Attwood, et al. (2007). "Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia." European Journal of Neuroscience **25**(11): 3453-3460.
- Ploughman, M., V. Windle, et al. (2009). "Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats." Stroke **40**(4): 1490-1495.
- Pulsinelli, W. (1992). "Pathophysiology of acute ischaemic stroke." Lancet **339**(8792): 533-536.
- Redecker, C., W. Wang, et al. (2002). "Widespread and long-lasting alterations in GABA-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes." J. Cereb. Blood Flow Metab. **22**: 1463-1475.
- Robinson, R. G., S. K. Schultz, et al. (2000). "Nortriptyline Versus Fluoxetine in the Treatment of Depression and in Short-Term Recovery After Stroke: A Placebo-Controlled, Double-Blind Study." Am J Psychiatry **157**(3): 351-359.
- Rogozinska, K. and J. Skangiel-Kramska (2010). "Effect of focal cerebral ischaemia on modulatory neurotransmitter receptors in the rat brain: An autoradiographic study." Journal of Chemical Neuroanatomy **40**(3): 232-238.
- Roux, P. and P. Barker (2002). "Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor." Progress in Neurobiology. **67**: 203-233.
- Savitz, S. I. and M. Fisher (2007). "Future of neuroprotection for acute stroke: In the aftermath of the SAINT trials." Annals of Neurology **61**(5): 396-402.

- Singer, A., M. Wonnemann, et al. (1999). "Hyperforin, a Major Antidepressant Constituent of St. John's Wort, Inhibits Serotonin Uptake by Elevating Free Intracellular Na<sup>+</sup>1.1." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **290**(3): 1363-1368.
- Smith, D., C. Dempster, et al. (2002). "Efficacy and tolerability of venlafaxine compared with selective serotonin reuptake inhibitors and other antidepressants: a meta-analysis." The British Journal of Psychiatry **180**(5): 396-404.
- Stemer, A. and P. Lyden (2010). "Evolution of the Thrombolytic Treatment Window for Acute Ischemic Stroke." Current Neurology and Neuroscience Reports **10**(1): 29-33.
- Stroemer, R. P., T. A. Kent, et al. (1995). "Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats." Stroke **26**: 2135-2144.
- Takatsuru, Y., D. Fukumoto, et al. (2009). "Neuronal Circuit Remodeling in the Contralateral Cortical Hemisphere during Functional Recovery from Cerebral Infarction." The Journal of Neuroscience **29**(32): 10081-10086.
- Tomasetti, C., C. Dell'Aversano, et al. (2011). "The acute and chronic effects of combined antipsychotic-mood stabilizing treatment on the expression of cortical and striatal postsynaptic density genes." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **35**(1): 184-197.
- Tsankova, N. M., O. Berton, et al. (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." Nat Neurosci **9**(4): 519-525.
- Tugwood, J. D. and C. T. Montague (2002). "Biology and toxicology of PPARgamma ligands." Hum Exp Toxicol **21**(8): 429-437.
- Wang, L. E., G. R. Fink, et al. (2010). "Noradrenergic enhancement improves motor network connectivity in stroke patients." Annals of Neurology: n/a-n/a.
- Wang, Q., X. N. Tang, et al. (2007). "The inflammatory response in stroke." Journal of neuroimmunology **184**(1): 53-68.
- Windle, V. and D. Corbett (2005). "Fluoxetine and recovery of motor function after focal ischemia in rats." Brain Research **1044**(1): 25-32.
- Winship, I. R. and T. H. Murphy (2008). "In Vivo Calcium Imaging Reveals Functional Rewiring of Single Somatosensory Neurons after Stroke." The Journal of Neuroscience **28**(26): 6592-6606.
- Wonnemann M, S. A., Müller WE (2000). "Inhibition of Synaptosomal Uptake of 3H-L-glutamate and 3H-GABA by Hyperforin, a Major Constituent of St. John's Wort: The Role of Amiloride Sensitive Sodium Conductive Pathways." Neuropsychopharmacology **23**(2): 188-197.
- Woods, D. F. and P. J. Bryant (1993). "ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions." Mechanisms of Development **44**(2-3): 85-89.
- Wu, P.-f., Z. Zhang, et al. (2010). "Natural compounds from traditional medicinal herbs in the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury." Acta Pharmacol Sin **31**(12): 1523-1531.
- Wu, Z., Y. Hayashi, et al. (2007). "Involvement of prostaglandin E2 released from leptomeningeal cells in increased expression of transforming growth factor-β in glial cells and cortical neurons during systemic inflammation." Journal of Neuroscience Research **85**(1): 184-192.
- Xu, X., L. Ye, et al. (2009). "Environmental Enrichment Induces Synaptic Structural Modification After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats." Experimental Biology and Medicine **234**(3): 296-305.

- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-415.
- Yu, Y., J.-R. Wang, et al. (2008). "Neuroprotective effects of atypical D1 receptor agonist SKF83959 are mediated via D1 receptor-dependent inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and a receptor-independent anti-oxidative action." Journal of Neurochemistry **104**(4): 946-956.