

## **EFFECTO DE LA NIMODIPINA EN RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA SEVERA**

Lilia del Riesgo Prendes <sup>1</sup> Nohora Yolanda Ardila González <sup>2</sup>, Nidia Consuelo Puerto Rincón <sup>3</sup>,  
Javier Gómez Meza <sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Medico Especialista en Bioquímica Clínica . Univ. Distrital F.J.Caldas

<sup>2</sup> Licenciadas en Biología, Univ. Distrital F.J.Caldas

<sup>3</sup> Medico Veterinario, Instituto Nacional de Salud

## RESUMEN

Ratas wistar de 24 h, fueron expuestas a un modelo de hipoxia crónica severa (100% de Nitrógeno/1h/4días consecutivos) y nimodipina (1mg/kg de peso corporal), i.p. este medicamento se aplicó a diferentes tiempos en relación con el evento hipóxico ( "B" se refiere al bloqueador de los canales de calcio esto es, a la nimodipina) , como sigue : EHB1 ( nimodipina : 5 minutos antes), EHB2 (nimodipina : 5 minutos después) ,EHB3 (cuatro dosis de nimodipina con intervalo de 1 hora, después ).A los 30 días se realizó un test de aprendizaje pasivo de evitación (AEP) y posteriormente se midió la concentración de proteínas totales en sistema nervioso central (SNC) .Los grupos EHB1 y EHB3 tuvieron un mejor resultado en el AEP, en las pruebas de retención (tiempo en el compartimento "A") : (180 seg), similar al grupo C (control) : 180 seg y comparados con los otros grupos. EH ( hipoxia sin medicamento) tuvo el menor tiempo en el compartimento "A"( en el AEP) : 141.26 seg .Asimismo el grupo con mayor concentración de proteínas totales en SNC fue el EHB1: 0.52 mg, similar al grupo C (0.58mg) y superior significativamente con los grupos EH (0.47 mg), EHB2 (0.28 mg) y EHB3 (0.44mg) .El efecto protector de la nimodipina puede estar sujeto al tiempo de aplicación de la droga.

Palabras claves : nimodipina, hipoxia, aprendizaje pasivo de evitacion, sistema nervioso central, proteínas.

## SUMMARY

24 hours-olds rat, were exposed to an hypoxic cronic model ( 100% of Nitrogen / 1hour/ four days) and nimodipine ( 1mg/kg ) i. p. as follows: EHB1 (five minutes before), EHB2 ( five minutes after) and EHB3 four dosis with an hour between each. At thirty days, rats were subjected to a passive advoidance learning test (PAL) and then were meassured the total protein in central nervous system (CNS).Groups EHB1 and EHB3 shows the better results in PAL , in retention tests both groups were 180 seconds (secs) , like the control group :180 secs., and better than the others groups: EH (experimental with hypoxia and without the droug) : time of remaining in A : 141 .26 secs .And the other hand, the group with better levels of total protein in CNS was EHB1, with 0.52 mg , similar as the Control group ( C ) : 0.58 mg, and significative upper than EH : 0.47 mg ,EHB2 : 0.28mg and EHB3 : 0.44mg.The protective effect of nimodipine could be related to the moment of its application.

Keys Words : nimodipine, hypoxia, passive advoidance learning, central nervous system, proteins.

## INTRODUCCION

La hipoxia es la causa más común de encefalopatía en el recién nacido(1) presentándose como una causa de parálisis cerebral, retardo mental, deficiencia en el aprendizaje, epilepsia, alteraciones en el comportamiento exploratorio (hiperactividad) y memoria espacial, asociados con daños a nivel de hipocampo y estados de hipoglucemia, hipocalcemia, policitemia, hiponatremia e hipertensión arterial (2,3).Se estima que de dos a cuatro niños de 1000 sufren asfixia antes y después del nacimiento. Aproximadamente del 15 al 20% de niños asfixiados que exhiben encefalopatía mueren durante el período postnatal, y de los sobrevivientes ,el 25% presentan deficiencias neurológicas permanentes (4).

El daño cerebral en la hipoxia isquémica empieza desde el momento en que se impide la toma de oxígeno y se extiende hasta después del período de reoxigenación ,agravando el daño tisular (5, 6). Las neuronas ubicadas entre el sitio del daño y el tejido no afectado son funcionalmente afectadas pero estructuralmente intactas, aún cuando la síntesis de proteínas se reduce al 50%. Estas neuronas corresponden a una región ubicada entre el

tejido dañado y el tejido normal que ha sido definida como zona de penumbra, que posee una considerable importancia clínica debido a que puede ser reactivada algún tiempo después incrementando el flujo sanguíneo (7).

A nivel celular el aporte energético de la glicólisis no puede mantener la demanda ,como resultado de lo anterior, la bomba de sodio y potasio, falla conduciendo a la entrada de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ , agua y a la acumulación de potasio en el espacio extracelular causando edema cerebral (8). Además, se produce la liberación de glutamato (aminoácido excitatorio), por los axones terminales incrementando la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  (9-12 )

Como resultado del incremento del calcio intracelular, se lleva a cabo la activación incontrolada de diversas enzimas (13-15). Los altos niveles de calcio, también ocasionan la degradación de proteínas como los receptores, transportadores celulares, enzimas y los reguladores de los niveles del calcio, especialmente en el hipocampo, donde la expresión de proteínas como la parvalbúmina se ve modificada,(16-17), lo que conduce al aumento del calcio libre intracelular y desórdenes en los mecanismos plásticos de algunas formas de aprendizaje en que está involucrada (Iuvone et al, 1996).

En el caso de animales en periodo perinatal ,los procesos de destrucción celular son rápidos , en las dos horas siguientes al episodio hipóxico, tiempo máximo para realizar la terapia (Vanucci & Perlman , 1997). Las drogas utilizadas, para minimizar el daño de la hipoxia, incluyen inhibidores de radicales libres, antagonistas de aminoácidos excitatorios , bloqueadores de canales de calcio, inhibidores de la óxido nítrico sintetasa, entre otras (Maurice et al, 1994; Saugstad et al, 1995 ; Maurice et al, 1999 ).

En este trabajo evaluamos el efecto de la NIMODIPINA . La nimodipina es una dihidropiridina selectiva para el tejido cerebral, debido a su alta liposolubilidad, a diferencia de otros bloqueadores ,.inicialmente se une a proteínas plasmáticas en un 95%, siendo rápida y completamente absorbida por el tejido con una vida media de 9 minutos a 1.5 horas. Su acción fisiológica es inhibir la entrada directa de iones calcio extracelulares por los canales dependientes del voltaje, operados por receptor y canales lentos .Los efectos bioquímicos de la nimodipina en la hipoxia, están relacionados con la zona de penumbra pero no el área directamente lesionada (18-20), (Drug information, 1996).

### **MATERIALES Y METODOS**

Se emplearon ratas wistar de 24 horas de nacidas , las cuales fueron distribuidas en los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo control (C) (sin medicamento).
2. Grupo experimental con hipoxia (EH) (sin medicamento).
3. Grupo experimental con hipoxia y bloqueador de canales de calcio (una dosis diaria por cinco días), 5 minutos antes de hipoxia (EHB1).
4. Grupo experimental con hipoxia y bloqueador de canales de calcio (una dosis diaria por cinco días), 5 minutos después de la hipoxia (EHB2).
5. Grupo experimental con hipoxia y bloqueador de canales de calcio (varias dosis, comenzando una hora después de la sesión de hipoxia y repitiendo este esquema cuatro veces después de cada sesión, durante todos los días que duró esta fase

experimental), (EHB3)

Se desarrolló un modelo de hipoxia crónica severa ,utilizando nitrógeno puro (100%) durante una hora diaria en una cámara herméticamente cerrada. Las exposiciones a nitrógeno, se repitieron a las 48, 72, 96 y 120 horas( Esta fase experimental duró cinco días consecutivos) . La dosis de la droga fue de 10mg/Kg de peso corporal, se realizaron las diluciones y se les aplicó 0.6ml/6g de peso corporal.

El grupo EH solo recibió la hipoxia. El grupo C recibió la siguiente manipulación: Fue colocado en una desecadora sin tapa en el mismo local en que estaba la cámara de hipoxia durante el tiempo que duró el evento hipóxico, todos los días de la fase experimental , exceptuando la exposición a nitrógeno y la aplicación del medicamento. A los grupos C y EH se les aplicó un volumen de solución salina fisiológica (Na Cl ,0.85% %), por vía intraperitoneal. de acuerdo al peso corporal de cada animal.

### **MODELO DE APRENDIZAJE PASIVO DE EVITACION**

A los treinta y dos días de nacidas se aplicó a todos los animales , una prueba de aprendizaje pasivo de evitación según Bures y Buresova (1963) con las modificaciones de Aquino, Cías y Col (1972).

Se utilizó una caja, con dos compartimentos, uno grande, iluminado (A)con 16 cuadrantes dibujados y el otro pequeño y oscuro (B) , con piso metálico electrificado ,separados por una puerta en guillotina . Cada sesión constaba de los siguientes pasos:

De forma individual cada rata, se ubicó en A por tres minutos para realizar la prueba de retención inicial (Ro), contando el número de cuadrantes recorridos por el animal durante

ese tiempo. A los tres minutos de exploración, la puerta en guillotina fue abierta, al entrar la rata al compartimiento B, (si la rata no entró en 180 seg. se ubicó con la mano), la puerta fue cerrada y se aplicaron choques eléctricos durante un minuto. Después del castigo y sin detener los choques eléctricos, la puerta se abrió permitiendo la salida de la rata y registrando el tiempo que empleó en salir de B hasta A (tiempo de escape, TE). Nuevamente se registró el tiempo de permanencia en A por un período de tres minutos realizando así la Prueba de Retención Inmediata( RI), la cual se repitió a las 24, 48, 72 y 96 horas ( R24, R48 R72, R96 ).

#### **MÉTODO DE BIURET PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS**

Concluida la prueba de aprendizaje las ratas se sacrificaron, para determinar las proteínas totales en Sistema Nervioso Central (SNC). Los animales se anestesiaron en una cámara con cloroformo y se sacrificaron para extraer el cerebro, el cual fue homogeneizado en un homogeneizador de Dounce, con solución salina fisiológica, hasta lograr un relación p/v del 10%;, luego se centrifugó a 5000 r.p.m. durante cinco minutos y en el sobrenadante se determinaron las proteínas totales mediante el método de Biuret. Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de ovoalbúmina de 0,05 g /100ml. Se leyó en cada tubo el porcentaje de transmitancia a una longitud de onda de 540 nm.

#### **PROCESAMIENTO ESTADISTICO**

Se aplicó el Test de la T o de Student, para series apareadas. Todos los grupos se

compararon entre sí. La diferencia entre los dos valores promedios comparados es significativa , cuando el valor obtenido para T es mayor que el valor de la tabla para el grado de libertad = ( N1 + N2 ) -2 y para una  $p \geq 0.05$ .

## RESULTADOS

### APRENDIZAJE PASIVO DE EVITACION

Excepto en la prueba de retención inicial (Ro) ,en la cual los animales de todos los grupos tuvieron un resultado similar con excepción de los animales del C con 67.11 seg (promedio mayor) y de EH con 37.22 seg (promedio menor) , el resto de los días el grupo que obtuvo un mayor tiempo en A fue el grupo C , similar resultado tuvieron los grupos EHB1 y EHB3.Las comparaciones entre los grupos fueron significativas.(ver Anexo Tabla y Gráfica 1).

**Tiempo de escape (TE):** en todos los grupos, el resultado fue similar sin presentar diferencias significativas en sus valores al aplicar el test estadístico.

### **Número de cuadrantes recorridos durante la prueba de aprendizaje.**

Los grupos control e hipóxicos con nimodipina 5 minutos antes y en dosis repetidas (C, EHB1 y EHB3) presentaron similitud en su recorrido, con promedios que variaron entre

267 a 287 cuadrantes, sin presentar diferencias significativas entre sí. Sin embargo el grupo experimental con hipoxia sin medicamento ( EH) con el promedio más bajo, mostró diferencias significativas con los demás grupos para una  $p \geq 0.05$ . De igual manera los animales del grupo con hipoxia y nimodipina 5 minutos después de la hipoxia (EHB2) recorrieron la mayor cantidad de cuadrantes con un promedio de 426, valor altamente significativo desde el punto de vista estadístico con respecto a los demás grupos, para una  $p \geq 0.05$  (ver en anexo Tabla y Grafica 2).

El AEP comenzó cada día a la misma hora :7:30 AM. La aplicación del AEP se llevó a cabo en la sala quirúrgica del Departamento de Experimentación del Bioterio del Instituto Nacional de Salud, esta sala se encuentra aislada del resto de los cubículos ,presenta control de ruidos, temperatura y humedad. La prueba de aprendizaje se realizó por el mismo investigador cada día , cada grupo de experimentación y cada animal de cada grupo fue sometido al aprendizaje en el mismo orden cada día durante los cinco días que duró esta fase experimental; los tiempos fueron medidos por el mismo investigador con un cronómetro. Estas medidas contribuyen a minimizar el posible efecto sobreañadido “manipulación” e “investigador” a la respuesta de cada animal al AEP. Durante las sesiones de aprendizaje solamente se mantenían en la sala los investigadores que participaron en la misma.

## **PROTEINAS TOTALES EN SNC**

Los grupos control e hipóxicos con nimodipina 5 minutos antes, (C y EHB1) con los mayores promedios, muestran similitud en sus valores y estos valores fueron significativos al compararlos con el resto de los grupos experimentales, los cuales presentaron valores significativamente más bajos, especialmente en el grupo EHB2 (Gráfica 3).

## **DISCUSION**

En este trabajo los animales de cada grupo compartieron una madre común debido a las características propias del diseño experimental aplicado , aunque todos pertenecieron a una misma cepa .

### **Pruebas de Retención**

Tomamos como criterio de aprendizaje ,cuando la conducta de las ratas que habitualmente tienden a buscar la oscuridad (compartimiento B), es modificada después de haber recibido el estímulo. A los efectos del modelo aplicado de AEP, cuando los animales sobrepasan el tiempo en el compartimento “A” : 3 DS( tres desviaciones estándar). Lo anterior se relaciona con la definición de aprendizaje dada por Domjan en 1999, en la que el aprendizaje es un cambio en los mecanismos de conducta y que resulta de la experiencia previa, es decir, asociado a los estímulos recibidos durante una experiencia anterior, esto es , el estímulo eléctrico, por lo cual evitan entrar al compartimento “B”.

Los resultados en la exploración inicial , muestran diferencias significativas entre el

grupo C respecto a EH, en la cual la entrada al cuarto oscuro, propio en estos roedores, fue más rápida por parte de este último. La diferencia del tiempo de exploración inicial del grupo EH respecto al grupo control, demuestra una hiperactividad en ellos, teniendo en cuenta que Iuvone et al, 1996, reportan resultados similares en el primer período de un test de aprendizaje (laberinto), con ratas sometidas a un modelo de hipoxia similar al nuestro (100 % N<sub>2</sub>). El anterior comportamiento, fue presentado especialmente en los animales sin medicamento (EH), con un promedio de tiempo menor y un número de cuadrantes recorridos igual al grupo control, aunque no mostró diferencias significativas al compararlos con los otros grupos. En la RI, pesar de que las diferencias con los otros grupos no son significativas, el grupo EH empieza a mostrar deficiencia en la respuesta al aprendizaje al igual que el grupo EHB2 en R48, entrando al compartimiento B antes de los 180 seg. Además, los animales de estos grupos, entraron nuevamente a este compartimiento durante R72 y la R96, los promedios en los dos fueron inferiores a 180 segundos, lo que pudiera estar asociado al tiempo de aplicación de la nimodipina al grupo EHB2 (tiempo entre la hipoxia y su aplicación), el cual debe estar asociado al posible efecto protector del mismo sobre los daños que produce la hipoxia en los procesos de aprendizaje y memoria reportados en la bibliografía (21). Le Blanc et al, 1993(22), publica que la nimodipina aplicada cinco minutos después no disminuye el daño producido por la hipoxia en un modelo experimental en cerdos lo que concuerda con lo observado en EHB2 tratado con nimodipina al mismo intervalo después de la hipoxia. En reportes de otros estudios, aplicación de la nimodipina quince minutos después del evento hipóxico, tampoco proporciona efectos benéficos en el control del daño cerebral (23).

En el caso del grupo EHB1 donde el medicamento fue aplicado cinco minutos antes de la hipoxia mostró mejores resultados en el test de aprendizaje respecto a EH con relación al tiempo de permanencia en A y al número de ocasiones en que los animales de este grupo (EHB1) entraron al lado B, donde se aprecia una respuesta similar a la del grupo EBH3 . De acuerdo con De Riu et al, 1995(24) y Robayo & Gómez en el mismo año (25) , la nimodipina aplicada antes del episodio hipoxico, ha sido efectiva en el incremento de la resistencia cerebral en reportes de estudios con modelos animales. Nuestro estudio concuerda con estos reportes ya que se observó un mejor resultado en el aprendizaje cuando la nimodipina fue aplicada cinco minutos antes, obteniéndose diferencia significativa en relación con los resultados del grupo sin medicamento EH . De forma similar al grupo EHB1, el grupo experimental EHB3 entró al compartimiento B en sólo una de las pruebas de retención : R96, durante los cinco días del test, demostrando que los grupos experimentales EHB1 y EHB3 tuvieron un mejor desempeño en el aprendizaje, lo cual pudiera estar relacionado a la repetición de las dosis del medicamento en este último grupo.

En 1997, Vetulanni et al (26), concluye que la nimodipina en ratas sanas no afecta los niveles de aprendizaje en un test pasivo de evitacion ,este reporte contribuye a descartar la posibilidad de que el medicamento haya influido de forma directa en este proceso. La posible causa de la poca efectividad de la nimodipina aplicada después de la hipoxia, en el rendimiento de los animales de este grupo en nuestro modelo experimental ( EHB2) , pudo estar relacionada con concentraciones del medicamento insuficientes , pues el grupo EHB3 recibió mayor dosis de la droga y mostró un mejor rendimiento en el

aprendizaje, por otra parte, el tiempo entre la hipoxia y la administración del medicamento según Le Blanc et al, en 1993 y Raju et al, en 1996, puede estar relacionado con el efecto del mismo y pudiese explicar nuestros resultados. Las deficiencias de aprendizaje en los grupos experimentales especialmente EH y EHB2 podrían explicarse a partir de los estudios realizados por Nabeshima et al, en 1991 (27) ,donde han comprobado la relación entre los procesos de aprendizaje y memoria en el test de evitación pasivo y la zona CA1 del hipocampo que resulta afectada en los estados hipóxicos debido a su alta vulnerabilidad a los bajos niveles de oxígeno (28) y demás efectos bioquímicos adversos relacionados con esta afección (Vanucci & Perlman, 1997).

### **Número de cuadrantes recorridos**

Uno de los parámetros dentro del modelo de AEP aplicado fue el número de cuadrantes recorridos por el animal, con el fin de determinar cambios en la conducta motora de los mismos durante el test, ya que la hiperactividad es una secuela de la hipoxia perinatal. Las diferencias fueron evidentes entre los grupos experimentales hipóxicos, sin medicamento y con nimodipina 5 minutos después (EH y EHB2) con respecto al resto de los grupos, mostrando los animales de dichos grupos una mayor actividad motora. Para los grupos experimentales hipóxicos con nimodipina en dosis única 5 minutos antes y en dosis repetidas después de la hipoxia (EHB1 y EHB3) se puede observar, según nuestros resultados, una conducta motora similar a la de los animales del grupo control, que puede relacionarse con el efecto del medicamento y el momento de aplicación de acuerdo al

evento hipóxico, pues estos mismos grupos mostraron mejores resultados en el test de aprendizaje en comparación con los otros grupos experimentales (EH y EHB2). Los animales del grupo hipóxico sin droga, mostraron una menor actividad que refleja lentitud en su movilidad ya que su promedio se encuentra por debajo de lo obtenido por los animales del grupo control, que pudo deberse a efectos secundarios a las condiciones del modelo de hipoxia aplicado, pues ese comportamiento se presentó en el transcurso de todo el experimento. Este resultado en un grupo de animales que presentaron hipoxia perinatal es antagónico con lo propuesto por la bibliografía, donde en un modelo similar de hipoxia (N<sub>2</sub> 100%), los animales presentaron hiperactividad causada por la misma (Iuvone et al, 1996). Aunque pudiera estar relacionada a la propia respuesta de estrés en este grupo.

### **PROTEÍNAS TOTALES EN SNC**

En reportes de estudios recientes se ha comprobado la disminución en la síntesis de proteínas durante y después de la hipoxia como resultado del incremento de calcio en el citoplasma celular (Bossenmeyer et al, 1998; Tuor et al, 1999). En nuestro trabajo se observó una reducción significativa en la cantidad de proteínas totales cerebrales en el grupo de hipoxia sin droga (EH), con respecto a los grupos control e hipóxico con nimodipina 5 minutos antes (C y EHB1), lo cual atribuimos a los mecanismos producidos involucrados en la posible disminución de la síntesis de proteínas, como es la activación de los receptores de glutamato que causan el aumento en la concentración de calcio intracelular (Dawson et al, 1992; Maurice et al, 1994). Los demás grupos experimentales que fueron sometidos a hipoxia también presentaron una variación entre ellos en la

concentración de proteínas respecto a los grupos C y EHB1, exhibiendo una disminución significativa, debido a que en cada grupo el medicamento fue aplicado de manera diferente y esto pudo influir en la modificación del efecto de inducción de la síntesis de proteínas como resultado de la neuroprotección ejercida por la nimodipina en las tres formas de aplicación, observándose que la administración del medicamento antes de la aplicación del modelo de hipoxia mantiene los niveles de proteínas similares a los del grupo control, lo que se relaciona con lo manifestado por Robayo & Gómez y De Riu et al, en 1995, que dan a conocer la efectividad del medicamento aplicado cinco minutos antes, mientras que en los grupos hipóxicos con nimodipina 5 minutos después y en dosis repetidas (EHB3 y EHB2) la concentración de proteínas cerebrales es inferior comparada con los grupos control e hipóxico con nimodipina 5 minutos antes (C y EHB1), lo que pudiera estar relacionado con el diseño de aplicación del medicamento y que posiblemente no es el más adecuado para producir el efecto protector.

## **CONCLUSIONES**

- Las ratas tratadas con nimodipina cinco minutos antes (EHB1) y en cuatro dosis diarias (EHB3), mostraron una mejor respuesta al AEP, lo cual debe estar relacionado con un mayor efecto protector del medicamento antes del evento hipóxico y en dosis repetitivas del mismo.
- La concentración de proteínas totales en SNC del grupo que recibió una dosis única de nimodipina cinco minutos antes del evento hipóxico (EHB1), similar al grupo control (C)

y superior al resto de los grupos experimentales, puede estar relacionado con un mayor efecto protector de la nimodipina que contribuye a disminuir el daño en las macromoléculas asociadas al almacenamiento de la información en SNC.

-Los niveles de proteínas cerebrales se ven afectadas por la hipoxia en la fase perinatal de las ratas y de igual manera la nimodipina puede también influir en estos niveles, de acuerdo al momento en que es aplicada (antes o después de la hipoxia).

## **RECOMENDACIONES**

-A las Instituciones que desarrollan investigaciones en el área básica y neonatal y a las entidades que prestan servicios de salud, desarrollar, fomentar y utilizar procedimientos adecuados que prevengan o disminuyan la mortalidad y morbilidad producidas por la hipoxia perinatal.

-A las Instituciones Educativas, tener en cuenta el desempeño académico individual para

poder relacionar algunas deficiencias en el aprendizaje con el estado de salud de los educandos, de esta manera se podrá brindar una atención integral a los mismos en la cual deberá jugar un papel central el BIENESTAR INSTITUCIONAL, conjuntamente con el claustro profesoral de la Institución Educativa.

-Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, realizar un estudio del efecto de la nimodipina aplicada 5 minutos antes del modelo de hipoxia utilizando animales de diferentes camadas.

-Continuar el estudio del efecto de este bloqueador de los canales de calcio en la hipoxia perinatal, con la aplicación de un modelo en el cual se estudie el efecto repetitivo de la aplicación del medicamento.

-Ensayar otros métodos más sensibles para la detección de las proteínas en tejido cerebral, como parámetro relacionado con el daño de la hipoxia experimental

### **AGRADECIMIENTOS**

-Al Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por su apoyo moral y material para la realización del Trabajo.

-Al Instituto Nacional de Salud por su colaboración humana y material, invaluable.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. DELL'ANNA, E. et al. Transient changes in fos and GFAP immunoreactivity precede neuronal loss in the rat hippocampus following neonatal anoxia. En: Experimental Neurology. Vol 131. 1995 ; p : 144-156.
2. VEXLER, Z. et al. Hypoxic and ischemic hypoxia exacerbate brain injury associated with metabolic encephalopathy in laboratory animals. En : The Journal Clinical Investigation . Vol. 93. 1994. p: 256-264 .
3. IUVONE, L; GELOSO, M. and DELL 'ANNA, E. Changes in open field behavior, spatial memory and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following. Enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. En: Experimental Neurology. Vol. 139: (1996) . p: 25-33.
4. TORO J y VALLEJO E. En: Tratado de neurología clínica. Colombia : Lerner .1994.
5. CHALEM, F. et al. En : Medicina interna. Vol. II. Santa Fé de Bogotá. Editorial Doyma Andina S.A. Segunda edición. 1992.
6. SAUGSTAD, D. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. En: Pediatrics. Vol. 98 (1) 1996. p: 103-107.
7. HOSSMANN, K. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. Annals of Neurology. En: Vol 36 (4) .1994: p: 557-565.
8. PERLMAN, J. M. Interventions for perinatal hypoxic-ischemia encephalopathy. En: Pediatrics. Vol 100(6) 1997. p: 1004-1014.
9. MAURICE, T. et al. The attenuation of learning impairments induced after exposure to CO or trimethyltin in mice by sigma ( $\sigma$ ) receptor ligands involves both  $\sigma$ -1 and  $\sigma$ -2

sites .En: British Journal of Pharmacology. Vol 127. 1999 . p: 335-342.

10.VANNUCCI, R. C. et al. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxia ischemic damage an experimental study in the immature Rat . En: Pediatrics . Vol 95(6) . 1995.p: 868-874.

11.MACAYA, A. et al. Molecular factors of cerebral hypoxia ischemical. En: Journal of Neurology.Vol 24(131).1996. p: 855-864.

12.HARMEN, H. et a. Effects of asphyxia on the fetal lamb brain .En: American Journal of Obstetrcyia and Gynecology. Vol 169(6) .1993. p: 1493-1501.

13. STRYER L.En: Bioquímica. Vol II. Barcelona .Ed. Reverté S.A. Cuarta edición. 1995.

14. DAWSON, M ; DAWSON, V. and SNYDER S. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide.En: American Neurological Association .Vol. 32 (3).1992. p: 297-311.

15. BOSSENMEYER, C. et al . Hypoxia/ reoxygenation induces apaoptosis trough biophasic in of protein synthesis in cultured rat brain neurons.En: Brain Research. Vol.48(1) .1998 p: 107-16.

16.TRIGGLE, D.and JANIS, R. The 1,4-dihydropiridine receptor a regulatory component of de Ca<sup>2+</sup> channel.En: Journal of Cardiovascular Pharmacology. Vol. 6 (suppl 7). 1984. p:949-955.

17. DRUG INFORMATIONS. En: Base de datos. Hemeroteca Nacional, ICFES, 1996.

18. BAYER. Nimotop (nimodipine). En: Prescribing information in physician desk

reference. 50<sup>o</sup> ed. Montvale. Medical Economics Company. 1996. p: 610-611.

19. SNYDER, S. and REYNOLDS, I. Calcium-antagonist drugs:receptor interaccions that clarify therapeutic effects.En: New England Journal of Medicine. Vol. 313.1985. p: 995-1002.

20. POZZILLI Carlo. Influence of nimodipine on cerebral blood . How in human cerebral ischaemia. En: Journal of Neurology. Vol. 236 .1989. p: 199-202.

21. MIYASAKI S; IMAIZUMI M and MACHIDA H The effects of anxiolytics and anxiogenixs on evaluation of learning and memory in an elevated plus- maze test in mice.En: Experimental Clinical Pharmacology . Vol. 17(2). 1995.p: 121-127.

22. LEBLANC, M. et al Use of polyethyleneglycol-bound superoxide dismutase, polyethyleneglycol-bound catalase and nimodipine to prevent hypoxic ischemic injury to the brain of newborn pigs. En: Pharmacology . Vol.21(2).1993. p: 252-259.

23. RAJU, T. N. et al. Effect of nimodipine on systemic, renal and cerebral hemodynamics after a mild hypoxic- ischaemic insult in newborn piglets.En : Pharmacology Research . Vol. 33(1).1996. p: 5-12.

24. DE RIU, E. et al . Brain electrobiogenesis protection induced by nimodipine and MK-801 during acute hypoxia en hypertensive rats. En: Pharmacology Research. . Vol. 31( 1 ) .1995. p: 169-173.

25. ROBAYO GOMEZ, J. Encefalopatía hipóxica isquémica neonatal y bloqueadores de canales de calcio. En: 2<sup>a</sup> Biental de Pediatría.Bogotá. Nov. 1994.

26. VETULANI, J ; BATTAGLIA M and SANSONE M. . Nimodipine on shuttle. Box

avoidance learning in mice: no impairment but slight improvement. En: Pharmacology and Biochemistry Behavior. Vol. 56(4) 1997 . p: 577-581.

27. NABESHIMA, Toshimura et al. Carbon monoxide induced delayed amnesia, delayed neuronal death and change in acetylcholine concentration in mice. En: The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics. Vol.256(1). 1991. p:378 –384.

28. TOWFIGHI, J. and MAUGER D. Temporal evolution of neuronal changes in cerebral hypoxia- ischemia in developing rats: a quantitative light microscopic study. En: Brain Research-development. Vol. 109(2).1998. p: 169-177.

#### **OTRAS REFERENCIAS CONSULTADAS**

ALEXANDER M. Specific semantic memory loss after hypoxic ischemic injury. En: Neurology. Vol. 48.1997. p: 165-173.

AQUINO - CIAS J. ANEIROS-RIBA R., FERNANDEZ-YERO F., HERNANDEZ-MESA N. Effects of epileptic focus on the visual cortex on passive avoidance learning. En: Physiology Behavior. Vol 8.1978. p: 957-963.

BROWN S, PIANTADOSI A. Recovery of energy metabolism in rat brain after carbon monoxide hypoxia . En: Journal Clinical Investigation. Vol 89.1992. p: 666-672 .

BARRIENTOS A., MORAES C. Titrating the effects of mitochondrial complex impairment in the cell physiology. En: The Journal of Biological Chemistry . Vol. 274 (23). 1999. p: 16188-16197.

BECKMAN S., BECKMAN T., CHEN J., MARSHALL P., FREEMAN B. Apparent hydroxyl

radical production by peroxinitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide . En: National . Academy of Science . Vol 87 .1994. p: 1620-1624.

## **ANEXOS**

### **RESULTADOS**

#### **APRENDIZAJE PASIVO DE EVITACION**

**Tabla 1. Tiempo de permanencia en A (seg.) en los diferentes grupos durante las pruebas de retención. El valor en la parte superior de cada cuadrante, corresponde al promedio y el valor de la parte inferior , a la desviación standard.**

Grupo	Ro	RI	R24	R48	R72	R96
Control	67.91	180	180	180	180	180
	67.11	0	0	0	0	0
EH	37.22	165.48	180	180	178.44	*141.26
	19.37	50.26	0	0	5.39	69.83
EHB1	43.57	180	180	180	175.16	180
	42.81	0	0	0	12.17	0
EHB2	40.38	180	180	167.34	164.02	165.82
	51.92	0	0	40.03	50.52	44.81
EHB3	41.94	180	180	180	152.26	180
	45.44	0	0	0	58.97	0

\*promedio de tiempo más bajo de permanencia en A que tuvo diferencias significativas con los demás grupos

**Gráfica 1. Diferencias en los promedios de tiempo durante la permanencia en el compartimiento A en las pruebas de retención del test de aprendizaje.**

**Tabla 2. Promedios desviaciones standard del número de cuadrantes recorridos durante el test pasivo de evitación.**

GRUPO	PROMEDIO	DESVIACION STANDAR
Control	267.6	103.76
EH	*160	66,8
EHB1	270	103.65
EHB2	*426	167.40
EHB3	287,9	110.02

\* menor y mayor promedio con diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.

**Gráfica 2. Promedio del total de cuadrantes recorridos por los animales de cada grupo.**

**Tabla 3. C      concentración de proteínas cerebrales por grupo.**

GRUPO	PROMEDIO(mg)	ABSORBANCIA
Control	*0.58	0.324
EH	0.47	0.288
EHB1	*0.53	0.320
EHB2	0.26	0.159
EHB3	0.44	0.270

\* promedios más altos en la concentración de proteínas cerebrales.

**Gráfica 3. Diferencias en las concentraciones de proteínas de los diferentes grupos.**