

## Segundo puesto

Premio internacional en investigación en ciencias de la salud: "Juan Jacobo Muñoz" edición 2011

# EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA FLUOXETINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL EN RATONES

<sup>1</sup>Londoño A.C. <sup>2</sup>Arango-Dávila C.A.,

1, Médico psiquiatra, Máster en ciencias básicas médicas - Colsanitas Cali, Universidad Libre de Cali.

2, Médico psiquiatra, Doctor en neurociencias - Colsanitas Cali, Fundación Valle del Lili de Cali, Universidad Icesi de Cali.

## RESUMEN

**Introducción:** la fluoxetina es un fármaco de amplio uso en la población para el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo. Su uso ha demostrado efectos directos en los procesos de plasticidad neuronal y aumento de la proliferación neuronal. **Objetivo:** evaluar el efecto de la fluoxetina sobre el compromiso neurológico y el volumen de la lesión en un modelo de isquemia cerebral focal. **Diseño:** se utilizaron 28 ratones distribuidos en cuatro grupos experimentales: fluoxetina y placebo con y sin lesión isquémica. Se administró fluoxetina vía intraperitoneal a una dosis de 20 mg/kg/día, una vez al día durante 21 días. La técnica de isquemia cerebral focal consiste en introducir por vía cervical a través de la arteria carótida interna un nylon monofilamento recubierto con poli-L-lisina que ocluye el origen de la arteria cerebral media, el nylon se retira del lecho arterial a los 30 minutos, lo que permite la reperfusión vascular. Los animales fueron evaluados a las 24 horas postisquemia utilizando la escala modificada de Bederson y el análisis del test conductual de campo abierto. Después de esto se determinó el volumen de tejido cerebral infartado utilizando el método 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride. **Resultados:** los ratones tratados con fluoxetina, a quienes se les realizó el procedimiento de isquemia-reperfusión cerebral, presentaron menor déficit neurológico ( $p=0.0001$ ) y menor porcentaje de lesión ( $p=0.003$ ), lo que se correlacionó significativamente con una mejoría en su trastorno motor. **Conclusión:** la fluoxetina parece tener un efecto neuroprotector en la isquemia cerebral en ratones. Este hallazgo estimula a continuar estudiando su papel en futuros ensayos preclínicos y clínicos en pacientes con accidente cerebro vascular.

**Palabras clave:** fluoxetina, isquemia cerebral, ratones, agentes neuroprotectores, regeneración nerviosa, plasticidad neuronal, trastornos psicomotores.

\*Correspondencia: anacarolina.londono@gmail.com - arangodavila@gmail.com  
Fecha de recepción: 3 de junio de 2011 - Fecha de aceptación: 12 de octubre de 2011

## NEUROPROTECTIVE EFFECT OF FLUOXETINE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF BRAIN ISCHEMIA IN MICE

### ABSTRACT

**Introduction:** fluoxetine is a drug of wide use in the treatment of mood disorders. In these conditions have been observed direct effects on neuronal plasticity and neuroregenerative properties. **Objective:** to evaluate the impact of fluoxetine over neurological impairment and ischemic volume in a model of brain ischemia. **Design:** we use 28 mice distributed into four experimental groups: fluoxetine and placebo with and without ischemic injury. Fluoxetine was administered by intraperitoneal injection at dose 20 mg/kg/day once daily for 21 days before ischemic surgery. The focal cerebral ischemia technique consist in enter through the internal carotid artery a monofilament nylon coated with poly-L-lysine until occlude middle cerebral artery, 30 minutes later the nylon is removed from the arterial, allowing vascular reperfusion. 24 hours after ischemia, the animals were behavioral neurological assessment using the modified Bederson scale and open-field behavioral test. After this, ischemic volume was determined using the method 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride. **Results:** mice treated with fluoxetine who underwent the procedure cerebral ischemia-reperfusion had a lower neurological deficit ( $p = 0.0001$ ) and lower percentage of injury ( $p = 0.003$ ), which was significantly correlated with improved of psychomotor disorders. **Conclusions:** fluoxetine seems to have a neuroprotective effect on cerebral ischemic in mouses. Our findings encourage us to continue studying its effect in future preclinical and clinical trials in patients with stroke and brain injury,

**Key words:** fluoxetine, brain ischemia, mice, neuroprotective agents, nerve regeneration, neuronal plasticity, psychomotor disorders.

### INTRODUCCIÓN

Las lesiones vasculares cerebrales corresponden a la tercera causa de muerte y la primera causa de incapacidad permanente en los países industrializados e implica altos costos sociales y financieros (1,2,3).

La ineficacia de los recursos terapéuticos existentes hasta el momento hace necesario establecer estrategias de investigación básica para poder profundizar en los aspectos fisiopatológicos y farmacológicos (4,5). Después de un accidente cerebrovascular del 18 al 78% de los pacientes presenta depresión (6,7), la cual se correlaciona con el aumento de la discapacidad (8) y de la estancia hospitalaria (9), por lo que es común que estos pacientes reciban un fármaco con propiedades antidepressivas (FPA). Dado que los efectos secundarios de los antidepressivos tricíclicos en pacientes de edad avanzada con complicaciones cardíacas limitan su prescripción (10), los FPA inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), como la fluoxetina, pasan a ser los antidepressivos más utilizados para el manejo de la depresión después del accidente cerebrovascular (11,8).

La fluoxetina ha demostrado un efecto neuroregenerador en estudios *in-vitro* e *in-vivo*, en los cuales se asocia al incremento de los procesos de neuritogénesis y estimulación

de la neurogénesis en el hipocampo del cerebro adulto (12, 13, 14). Dado que la fluoxetina ha sido ampliamente administrada por décadas de forma segura para manejar cuadros depresivos en pacientes con infarto cerebral (11,8), sus efectos en la recuperación de la función motora, la neurogénesis y la neuroprotección merecen ser investigados.

El presente trabajo consiste en evaluar la eficacia de la fluoxetina sobre el tamaño de la lesión y el compromiso neurológico en la isquemia cerebral inducida en ratones, contribuyendo de esta manera a la investigación preclínica sobre el efecto neuroprotector de los FPA en la lesión por isquemia cerebral, lo que favorece la toma de decisiones e investigación para otras etapas básicas y clínicas.

### METODOLOGÍA

#### Animales

Se utilizaron 28 ratones machos de la especie *Mus musculus* (albino suizo) de la cepa ICR, de un peso medio de 43.8 gramos, debidamente certificados y comprados al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), y manejados en el bioterio de paso, en jaulas con comida y agua ad libitum, a 25° de temperatura con periodos alternos de luz y oscuridad de 12 horas.

### Tamaño de la muestra y forma de muestreo

Se generaron controles del tratamiento administrado y de la cirugía de oclusión de la arteria cerebral media (ACM), con cuatro grupos experimentales así: fluoxetina con lesión isquémica, placebo con lesión isquémica, fluoxetina sin lesión isquémica (sham) y placebo sham. Para reducir la variabilidad entre animales y limitar su número, se tuvieron en cuenta los grupos homogéneos con garantías en procedencia, edad, peso, tamaño, sexo y lado de la intervención quirúrgica. Con base en lo descrito en los estudios de Longa en 1989 (15) y Belayev en 1999 (16) y por la experiencia de miembros del grupo con el procedimiento de isquemia en ratas, se decidió establecer un "n" de muestra por conveniencia. Para el análisis estadístico se trabajó con un n = 28, previendo que al tener una mortalidad de 60% fuera posible realizar las comparaciones en al menos 3 sujetos en cada uno de los 4 grupos. Una vez obtenidos los ratones, se procedió a distribuirlos aleatoriamente en cada uno de los grupos y a realizar el marcaje en las colas.

### Fluoxetina

Se utilizó fluoxetina pura sin excipientes, diluida en condiciones de esterilidad en solución salina al 0.9%, administrada por vía intraperitoneal a dosis de 20 mg/kg/día. En el grupo placebo se administró un volumen equivalente (solución salina 0.9%). Las dosis se suministraron una vez al día durante 21 días antes de la cirugía isquémica. El último tratamiento se realizó 24 horas antes de la cirugía.

### Técnica quirúrgica de la isquemia cerebral

Bajo el microscopio quirúrgico, se realiza una incisión longitudinal en la línea media del cuello; se disecciona y separa la piel y el tejido celular subcutáneo para continuar el procedimiento en el lado derecho. Se localiza la arteria carótida común (ACC), la cual se disecciona y se separa cuidadosamente del nervio vago; rostralmente se localiza la bifurcación carotí-

dea, se disecciona la arteria carótida externa (ACE) y se ligan sus ramificaciones, logrando liberar la ACE y ligarla en su extremo en forma de fondo de saco. Luego se localiza la porción más rostral extracraneal de la arteria carótida interna (ACI) y cerca a la base del cráneo; se liga la arteria pterigopalatina. Así se logra que la ACI sea el único remanente de la ACC.

Se utiliza la técnica descrita por Belayev para la obstrucción efectiva de la ACM con reperfusión a los 30 minutos (16). A los ratones controles se les practica un procedimiento similar a excepción de la introducción del nylon monofilamento hasta el nivel de la ACM. A los animales se les permite el libre acceso a agua y alimentos antes y después de la cirugía.

### Evaluación neurológica conductual

Los especímenes de los grupos experimentales y los controles fueron pesados y sometidos a una evaluación neurológica conductual a las 24 horas post isquemia. El déficit neurológico se definió de acuerdo con la escala de Bederson y cols. 1986 (17) adaptada por Yrjänheikki y cols. 2005 (18), teniendo en cuenta que la lesión ha sido ocasionada en el hemisferio derecho. (Tabla 1)

Los ratones fueron expuestos al Test de Campo Abierto, instrumento utilizado para evaluar las funciones motoras en ratas después de isquemia focal (19). Este test se realiza mediante registro fílmico luego de 24 horas post isquemia; se introduce el ratón por 5 minutos en el centro del instrumento, un espacio cuadrado de 50 cm de lado y de 40 cm de alto dividido en 16 cuadrantes, observando y cuantificando el desplazamiento, el tiempo de acicalado, el número de bipedestaciones y el número de casillas pisadas. Todos estos datos son procesados con el software de video de seguimiento ANY-maze versión 4.70 (Stoelting, USA).

### Cuantificación del tamaño de la lesión vascular

La determinación del volumen de tejido cerebral infartado se

**TABLA 1. Escala de déficit neurológico modificada de Bederson.**

0	Ausencia de movimiento espontáneo.
1	Movimiento circular espontáneo hacia el lado parético.
2	Movimiento circular hacia el lado patético, si se hala de la cola.
3	Movimiento circular hacia el lado patético, si se hala y se levanta de la cola.
4	Resistencia reducida al empujarla lateralmente hacia el lado parético.
5	Flexión continua del miembro delantero contralateral al hemisferio lesionado.
6	Extensión normal de ambos miembros anteriores hacia el piso, si se hala de la cola.

evaluó utilizando el método 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) descrito en los estudios de Belayev, en 1999, y por otros autores (20). La sal tetrazolium del TTC (Sigma, St. Louis, MO) es reducida gracias a la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa mitocondrial transformándose en un producto liposoluble “rojo-formazan”. El tejido viable se tiñe de un color rojo profundo, mientras la zona infartada permanece sin teñir, dada su condición de inactividad enzimática. El TTC actúa como un aceptor de protones del sistema enzimático oxidativo mitocondrial, que es dependiente del metabolismo celular para mantener un estado funcional. Si la isquemia cerebral se mantiene, las enzimas oxidativas mitocondriales se tornan disfuncionales y el TTC no se reduce a su forma roja, dando como resultado un área pálida en el cerebro.

El TTC provoca preparaciones de alto contraste para la determinación del volumen de tejido infartado usando para ello cortes en transparencias obtenidas con cámara digital. Las imágenes son analizadas con el software Image/J versión 1.0, programa de dominio público de Java para el procesamiento y análisis de imágenes del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (21), el cual se utilizó para calcular e integrar las áreas infartadas en relación con el tejido normal. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (30 mg/kg) y Xylacina (2 mg/kg) vía intraperitoneal, 24 horas después de la reperfusión son perfundidos por vía transcardiaca con 50 ml de solución salina normal al 0,9%. El manejo del tejido y el procedimiento de determinación del volumen lesionado por TTC se realizó de acuerdo con el protocolo de Yang y Shuaib (20). Las láminas procesadas de cerebro se fotografían y se conservan en buffer de paraformaldehído al 4%.

El tamaño del infarto cerebral es cuantificado con el software Image/J versión 1.0 y las áreas de infarto son integradas para calcular el volumen del infarto. El volumen total de cada hemisferio y el infarto se determina mediante la integración de las áreas en cada lámina utilizando la siguiente fórmula:

- Volumen del infarto = [volumen del hemisferio izquierdo - (volumen del hemisferio derecho - la media del volumen del infarto)] / volumen del hemisferio izquierdo.

Para compensar el edema cerebral en el hemisferio isquémico, se corrige el volumen del infarto en cada ratón (22) mediante el cálculo del volumen global de los hemisferios izquierdo y derecho, aplicando la siguiente fórmula:

- Volumen del infarto corregido = volumen del hemisferio izquierdo - (volumen del hemisferio derecho - volumen de la medida del infarto).

El volumen de infarto se expresa en milímetros cúbicos (mm<sup>3</sup>) y porcentaje.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al menos 3 especímenes fueron estudiados para cada grupo experimental. Para las variables numéricas se calcularon medidas de tendencia central (media y mediana) y medidas de variabilidad: desviación estándar (DE) y rango intercuartil (RI). Para validar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para la comparación de los 4 grupos: fluoxetina isquemia, fluoxetina sham, placebo isquemia, y placebo sham, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Las comparaciones múltiples se realizaron con el procedimiento Dunn. Para todos los análisis un valor  $p < 0.05$  fue adoptado para la significancia estadística. Los análisis se realizaron en el paquete estadístico Stata 10.0.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todas las actividades de laboratorio fueron fundamentadas en el manual de Buenas Prácticas de Laboratorio basado en las normas internacionales (CCAC Guidelines on: Animal Use Protocol Review 1997), que reglamentan el mantenimiento de la infraestructura, registros, manejo y disposición de muestras, control de reactivos y limpieza del material. El procedimiento experimental en animales fue evaluado y autorizado por el comité de ética de la Universidad Libre, seccional Cali (Resolución Rectorial 025 de 2002). Así mismo, fue respaldado y autorizado por el comité de ética de la Universidad del Valle de Cali, en un comunicado del 9 de noviembre de 2009. Los animales fueron manipulados teniendo en cuenta las recomendaciones de la resolución No 8430 de 1993 (Título V) del Ministerio de Salud Nacional de Colombia y las guías NIH, teniendo especial cuidado en minimizar el sufrimiento animal y utilizar la mínima cantidad de animales.

## RESULTADOS

La mortalidad del procedimiento durante y posterior a la cirugía fue del 42.8 %: murieron 12 ratones: 14.3% del grupo placebo isquemia, 7.1% del grupo fluoxetina isquemia, 7.1% del grupo placebo sham (control) y 14.3% del grupo fluoxetina sham. Después de la cirugía todos los ratones

presentaron pérdida de peso. No se encontró una diferencia significativa en las pendientes de los ratones tratados con fluoxetina y las del grupo placebo.

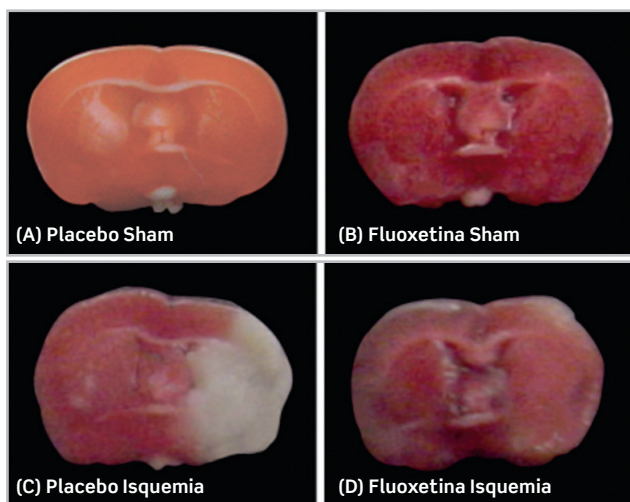
En el grupo tratado con fluoxetina se observa un menor déficit neurológico ( $p = 0.0001$ ) y menor porcentaje en el volumen de la lesión (figura 1), que se correlaciona en el análisis conductual con un aumento en la distancia recorrida por los animales; por lo tanto, un menor déficit motor. (Tabla 2).

En las comparaciones múltiples entre los 4 grupos para el déficit neurológico, la significancia  $p < 0.05$  se mantuvo entre cada uno de los 4 grupos. La fluoxetina redujo signi-

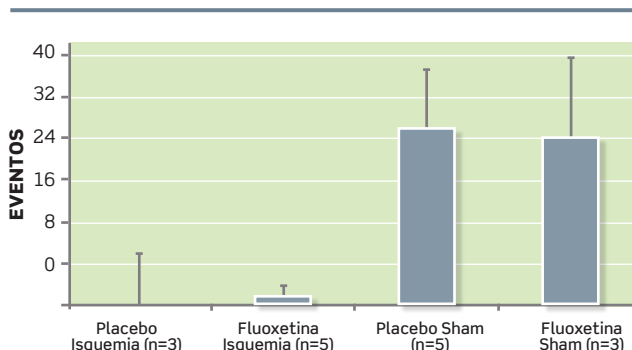
ficativamente el déficit neurológico con respecto a los controles tal como se puede observar en las mediciones del test de campo abierto. El grupo tratado con fluoxetina en el cual se realizó la isquemia presentan un mejor comportamiento motor frente al grupo placebo en el que realizó la isquemia.

En la bipedestación, el grupo placebo sham presentó una mediana de 27 eventos (RI = 18-36); en el grupo fluoxetina sham la mediana fue de 25 eventos (RI = 12-38); en el grupo placebo isquemia la mediana fue 0 eventos (RI = 0-8) y en el grupo fluoxetina isquemia la mediana fue 1 evento (RI = 0-2). Al comparar todos los grupos se obtiene una  $p = 0.0001$ . Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los grupos placebo sham y fluoxetina sham. (Figura 2)

En el acicalamiento, en el grupo placebo isquemia la mediana fue de 3 eventos (RI = 1-3); el grupo placebo sham presentó una mediana de 18 eventos (RI = 12-18); en el grupo fluoxetina isquemia la mediana fue de 4 eventos



**Figura 1.** Cortes coronales comparativos de cerebro del ratón teñido con la técnica TTC. A y B se encuentran los controles: placebo sham y fluoxetina sham. En C y D se observan el control isquemia y la fluoxetina isquemia. En este corte se observa que el área lesionada del control isquemia corresponde al 35% del hemisferio derecho, mientras que el cerebro del ratón que recibió fluoxetina presenta una lesión del 4% en la corteza cerebral del hemisferio derecho.

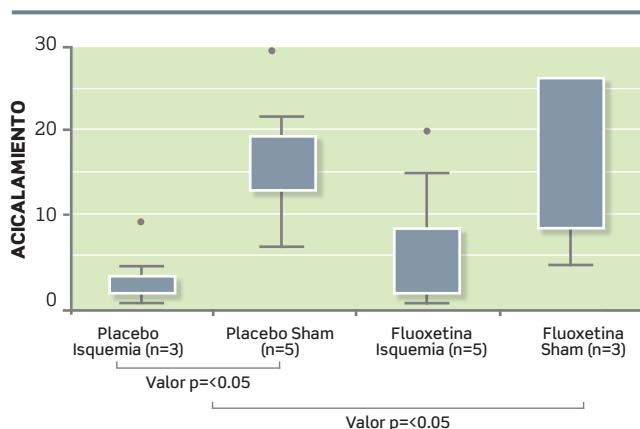


**Figura 2.** Bipedestación. Las barras representan la mediana de los eventos de bipedestación en cada grupo. Las barras de error representan el rango intercuartil (RI). En la gráfica no se observan diferencias entre los grupos placebo y fluoxetina.

TABLA 2. Volumen de la lesión e incapacidad para el desplazamiento.				
Grupo	Déficit neurológico (*)	Lesión	Volumen de lesión (mm <sup>3</sup> )	Distancia (mt)
%				
Placebo Sham (n=5) Mediana	6	0	0	21.3
RI	6 - 6	0 - 0	0 - 0	9.5 - 26.3
Fluoxetina Sham (n=3) Mediana	6	6	0	16.4
RI	6 - 6	0 - 0	0 - 0	7.3 - 16.4
Placebo Isquemia (n=3) Mediana	1	24	134	1.4
RI	0 - 6	2 - 24	12 - 134	0.1 - 12
Fluoxetina Isquemia (n=5) Mediana	5	7	39	3.4
RI	1 - 5	4 - 17	20 - 95	0.6 - 3.4
Valor P (Kruskal-Wallis)	0.0001	0.0030	0.0031	0.0005

(\*) Escala De Bederson

(RI = 1-8), y en el grupo fluoxetina sham la mediana fue de 17 eventos (RI = 8-24). Al comparar todos los grupos, se obtiene una  $p = 0.0002$ . Al realizar el análisis multivariado entre cada uno de los grupos la significancia  $p < 0.05$  se mantiene entre placebo isquemia y placebo sham, y entre placebo isquemia y fluoxetina sham. Estos datos se muestran graficados en la Figura 3.



**Figura 3.** Acicalamiento. Las barras representan la distribución de los eventos de acicalamiento en cada grupo. Las líneas describen los valores máximos, mínimos y la distribución de la mediana. Los puntos sobre las columnas corresponden a un dato que se comporta diferente frente a su grupo. En la gráfica se observa mayor cantidad de eventos de acicalamiento de los ratones con isquemia y fluoxetina frente a los que no recibieron fluoxetina.

En la tabla 3 se reportan las medianas y sus respectivos RI de las variables de tiempo de movilidad, cantidad de líneas cruzadas, rotaciones totales y su discriminación entre

rotaciones en sentido a las manecillas del reloj y en sentido contrario. Se anotan los valores de significancia de la comparación de los datos. Las comparaciones múltiples entre los 4 grupos para las variables de tiempo de movilidad fueron significativas entre placebo sham y fluoxetina isquemia y entre fluoxetina isquemia y fluoxetina sham; para la cantidad de líneas cruzadas fueron significativas entre placebo isquemia y placebo sham, y placebo sham y fluoxetina isquemia. Como esperábamos, al evaluar la rotación (movimiento circular), observamos que los ratones lesionados presentaron movimiento circular hacia el lado parético (en sentido de las manecillas del reloj), y no existen diferencias significativas entre los grupos comparados con una  $p > 0.05$ .

### DISCUSIÓN

Este estudio sugiere que existe un efecto neuroprotector asociado a la fluoxetina en la isquemia cerebral en ratones, observación acorde a lo descrito en humanos por Pariente y colaboradores, en 2001 (23), quienes muestran la mejoría en el rendimiento motor después de la isquemia cerebral en aquellos pacientes que recibieron fluoxetina.

La recuperación de la función motora en sujetos con accidente cerebrovascular que han recibido fluoxetina podría estar asociada a diferentes mecanismos: efectos directos en los procesos de plasticidad cerebral, aumento de la proliferación celular, disminución de la apoptosis en el giro dentado (12), participación en la vía del CREB (cyclic AMP response element binding protein) que aumenta los niveles de BDNF

TABLA 3. Comportamiento motor de los grupos tratados con fluoxetina y placebo.					
Grupo	Tiempo de movilidad (seg)	Líneas cruzadas	Rotaciones	Rotaciones manecillas del reloj	Rotaciones contra el reloj
Placebo Sham (n= 5) Mediana	234	163	11	4	5
RI	149 - 269	76 - 210	7 - 15	3 - 8	3 - 9
Fluoxetina Sham (n= 3) Mediana	196	64	7	3	4
RI	164 - 242	49 - 104	5 - 8	2 - 4	2 - 6
Placebo Isquemia (n=3) Mediana	80	16	7	2	0
RI	8 - 209	1 - 94	0 - 12	0 - 8	0 - 4
Fluoxetina Isquemia (n=5) Mediana	41	18	3	0	0
RI	14 - 70	8 - 24	1 - 4	0 - 2	0 - 1
Valor P (Kruskal-Wallis)	0.0008	0.0002	0.0033	0.0681	0.0023



(Brain Derived Neurotrophic Factor) (24,25,26,27), supresión de la inducción de marcadores proinflamatorios (28), regulación de la glutamato peroxidasa (GluP) y la superóxido dismutasa-1 (SOD-1) (29) y estímulo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (5-Hydroxytryptamine 1A) (30,31,32).

En este experimento se administró el medicamento por 21 días para semejar las condiciones del tratamiento realizado en la depresión, donde se observan los fenómenos de plasticidad y neurogénesis a partir de la segunda semana de suministro (31). Nuestros resultados apoyan el papel neuroprotector de la fluoxetina, con una diferencia significativa con relación a los controles en el volumen de lesión ( $p=0.0030$ ), menor déficit neurológico ( $p=0.0001$ ), mayor distancia recorrida ( $p=0.0005$ ), mejor capacidades para la bipedestación ( $p=0.0001$ ) y para el acicalamiento ( $p=0.0002$ ).

De esta manera se complementan y corroboran los hallazgos en protección neuronal encontrados por Lim, en 2009 (33), en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas, en el cual se observó igualmente la reducción del volumen del infarto y la mejoría en el déficit neurológico con la administración endovenosa del medicamento después de 9 horas de la reperfusión. Este hallazgo nos permite afirmar que el pre-tratamiento por 21 días con fluoxetina reduce significativamente el tamaño del infarto y el déficit neurológico en ratones sometidos a isquemia reperfusión, por lo cual se puede plantear como una alternativa terapéutica en el tratamiento del ACV. Dado que hasta el momento no existen tratamientos definidos para disminuir el infarto cerebral y sus consecuencias, la fluoxetina, un medicamento de amplio uso, económico y de reconocida seguridad, puede plantearse como una estrategia de uso masivo que beneficiaría a las poblaciones.

Estos resultados nos alientan a realizar futuros estudios donde se evalúe el efecto de la administración del tratamiento después de la isquemia por oclusión de la arteria cerebral media y a aplicar métodos histopatológicos para la evaluación del daño isquémico cerebral y la citoprotección, con el fin de dilucidar los efectos de este medicamento en la estructura cerebral.

Los modelos preclínicos de isquemia han permitido ampliar el conocimiento de la reparación neural, identificando posibles sistemas de reorganización celular y molecular. También han servido para desmitificar ciertas barreras conceptuales que limitan la generación de estudios de agentes

potencialmente útiles. Actualmente, se trabaja en una concepción dinámica de la estructura del cerebro y la conectividad, por los hallazgos de plasticidad y neurogénesis en ciertas estructuras especializadas como el hipocampo. Los primeros estudios en la reparación neural después de un accidente cerebrovascular sugiere que las proteínas asociadas al crecimiento comúnmente relacionados con los conos de crecimiento axonal fueron inducidos en los seres humanos y animales en el tejido peri-infarto (34,35). Estudios posteriores ampliaron estas conclusiones con el análisis cuantitativo de las conexiones axonales para mostrar que el cerebro adulto forma nuevas conexiones en la corteza peri-infarto, y en las proyecciones de la corteza opuesta a la isquemia (36,37,38). Además, se establecieron los procesos de reparación mediante la neurogénesis de novo en el cerebro adulto que posibilita ampliar la visión y las estrategias terapéuticas (39).

Existe la limitante de que los modelos experimentales reproducen una situación que no es exactamente igual a la que caracteriza la isquemia en humanos, por lo que los resultados obtenidos en los estudios experimentales deben interpretarse con precaución. Siendo que algunos de los fármacos estudiados en los modelos experimentales, no han mostrado eficacia en la práctica clínica y no han pasado de esta fase de estudio. Consideramos pertinente seguir evaluando la potencialidad y los mecanismos de los FPA como medicamentos neuroprotectores en los modelos de isquemia cerebral en ratones para poder trascender a los ensayos clínicos.

## CONCLUSIONES

El pre-tratamiento por 21 días con fluoxetina a una dosis de 20 mg/kg reduce significativamente el tamaño del infarto y el déficit neurológico en ratones sometidos a isquemia reperfusión cerebral, por lo que se puede plantear como una alternativa terapéutica en el tratamiento del ACV en humanos en futuros estudios clínicos.

## CONFLICTO DE INTERÉS Y FINANCIACIÓN

Se declara la no existencia de conflicto de interés. Si bien la fluoxetina fue donada por el Laboratorio Tecnoquímicas de Colombia, los autores declaran que no existe ningún tipo de compromiso de autoría de los resultados ni de tipo comercial con el laboratorio. Este trabajo de investigación se ha realizado con completa independencia de la industria farmacéutica.

## FINANCIACIÓN Y AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Libre y en especial al decano de la facultad, doctor Luis Edilberto Blandón; al director de investigaciones, doctor Alejandro Baena; al doctor José

Humberto Jiménez, jefe del área de ciencias básicas, por el apoyo logístico y económico para este proyecto. Al equipo de colaboradores del grupo de investigación en neurociencias, salud mental y psiquiatría de la Universidad Libre, de Cali.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kasner E, Saver J, Levine S. High lights from the 25th Annual International Stroke Conference. 2000; 10-12.
- Brodsky H, Altendorf A, Withall A, Sachdev PS. Mortality and Institutionalization in Early Survivors of Stroke: The Effects of Cognition, Vascular Mild Cognitive Impairment, and Vascular Dementia. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2010; 19:485-493.
- Hong KS, Saver JL. Years of disability-adjusted life gained as a result of thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *Stroke.* 2010; 41:471-477.
- World Health Organization. Task Force on Stroke preventions and other Cerebrovascular Disorders: recommendation on stroke preventions, diagnosis and therapy. *Stroke.* 1989; 20: 1407-1431.
- Ratan RR. Beyond Neuroprotection to Brain Repair: Exploring the Next Frontier in Clinical Neuroscience to Expand the Therapeutic Window for Stroke. *Transl Stroke Res.* 2010; 1:71-73.
- Singh A, Black SE, Herrmann N, Leibovitch FS, Ebert PL, Lawrence J, Szalai JP. Functional and neuroanatomic correlations in poststroke depression: the Sunnybrook Stroke Study. *Stroke.* 2000; 31: 637- 644.
- Arango CA, Pimienta HJ, Escobar M. Depresión postisquemia cerebral: aproximación clínica y fisiopatológica. *Revista Colombiana de Psiquiatría.* 2000; 4: 321-344.
- Paolucci S, Antonucci G, Grasso MG, Morelli D, Troisi E, Coiro P, De Angelis D, Rizzi F, Bragoni M. Post-stroke depression, antidepressant treatment and rehabilitation results. A case-control study. *Cerebrovasc Dis.* 2001; 12: 264- 271.
- Gillen R, Tennen H, McKee TE., Gernert-Dott P, Affleck G. Depressive symptoms and history of depression predict rehabilitation efficiency in stroke patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001; 82: 1645- 1649.
- Robinson RG. Poststroke depression: prevalence, diagnosis, treatment, and disease progression. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 376-387.
- Gupta A, Pansari K, Shetty H. Post-stroke depression. *Int J Clin Pract.* 2002; 56: 531- 537.
- Lee HJ, Kim JW, Yim SV, Kim MJ, Kim SA, Kim YJ, Kim CJ, Chung JH. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol Psychiatry.* 2001; 610: 725-728.
- Wright SC, Zhong J, Larrick JW. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J.* 1994; 8: 654- 660.
- Peer D, Dekel Y, Melikhov D, Margalit R. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res.* 2004; 64: 7562-7569.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20: 84-91.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res.* 1999; 833:181-190.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 1986; 17: 472-476.
- Yrjänheikki J, Koistinaho J, Kettunen M, Kauppinen RA, Appel K, Hüll M, Fiebich BL. Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Research.* 2005; 1052: 174-179.
- Wahl F, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Neurological and Behavioral Outcomes of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke.* 1992; 23: 267-272.
- Yang Y, Shuaib A, Li Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *Journal of Neuroscience Methods.* 1998; 84: 9-16.
- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with Image J. *Biophotonics International.* 2004; 11: 36-42.
- Roulston CL, Callaway JK, Jarrott B, Woodman OL, Dusting GJ. Using behavior to predict stroke severity in conscious rats: post-stroke treatment with 3', 4'-dihydroxyflavonol improves recovery. *Eur J Pharmacol.* 2008; 584:100-10.
- Pariante J, Loubinoux I, Carel C, Albuher JF, Leger A, Manelfe C, Rascol O, Chollet F. Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. *Ann Neurol.* 2001; 50: 718- 729.
- Haynes LE, Barber D, Mitchell U. Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. *Brain Res.* 2004; 1026: 157-167.
- Cavus I, Duman RS. Influence of estradiol, stress, and 5-HT2A agonist treatment on brain-derived neurotrophic factor expression in female rats. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 59-69.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1997; 54: 597-606.
- Duman RS. Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biol Psychiatry.* 1998; 44: 324-335.
- Jin Y, Lim CM, Kim SW, Park JY, Seo JS, Han PL, Yoon SH, Lee JY. Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *Brain Research.* 2009; 1281:108-116.
- Kim DH, Li H, Yoo HL, Lee BH, Hwang IK, Won MH. Effects of fluoxetine on ischemic cells and expressions in BDNF and some antioxidants in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia. *Experimental Neurology.* 2007; 204: 748-758.



30. Jacobs BL, Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry*. 2000; 5: 262-269.
31. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000; 20: 9104 - 9110.
32. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003; 301:805-809.
33. Lim CM, Kim SW, Park JY, Kim C, Yoon SH, Lee JK. Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. *J Neurosci Res*. 2009; 87:1037-1045.
34. Ng SC, de la Monte SM, Conboy GL, Karns LR, Fishman MC. Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron*. 1988; 1: 133-139.
35. Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*. 1995; 26: 2135-2144.
36. Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, Woolsey TA. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis*. 2001; 8: 910-922.
37. Chen J, Shen C, Meller E. 5-HT1A receptor-mediated regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2002; 452:155-162.
38. Dancause N, Barbay S, Frost SB, Plautz EJ, Chen D, Zoubina EV, Stowe AM, Nudo RJ. Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci*. 2005; 25: 10167-10179.
39. Rola R, Mizumatsu S, Otsuka S, Morhardt DR, Noble-Haeusslein LJ, Fishman K, Potts MB, Fike JR. Alterations in hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury in mice. *Experimental Neurology*. 2006; 202: 189-199.