

194

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

"Evaluación del déficit motor y daño celular en la  
corteza cerebral de rata posterior a una  
isquemia fototrombótica"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA  
P R E S E N T A  
M<sup>rs</sup> DE LA LUZ PALACIOS VILLAVICENCIO

DIRECTORA DE TESIS: LOURDES MASSIEU TRIGO  
REVISOR: ALFONSO SALGADO ESCOBAR

MEX, D.F. a de de 2001

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi mamá: Luz Villavicencio Herrera  
y

A mi papá: Aurelio Palacios Mejía

POR SER Y ESTAR

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Simón Brailowsky Klipstein\*, con quien se inició y desarrolló la mayor parte del trabajo experimental de éste proyecto.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo, quien me permitió concluir el trabajo iniciado y por su paciencia al brindarme una última oportunidad, especialmente a ti "GRACIAS".

A la bióloga Tere Montiel, por el aprecio que me inspira y por que todo lo que te han dicho tus tesisistas es cierto, siempre estás ahí.

Al físico Arturo Nogueira, porque gracias a su ingenio y a su concreta y sencilla visión logramos reducir los costos a casi nada, Y porque sin ello hubiera sido más difícil la realización de lo que hoy presento.

A mis hermanos porque todos sin excepción alguna me caen muy bien.

\* Que está de vacaciones



## INDICE

RESUMEN	6
I. ANTECEDENTES	
1. ISQUEMIA CEREBRAL	7
1.1. ISQUEMIA GLOBAL	9
1.1.1 MODELOS DE ISQUEMIA GLOBAL	10
1.2. ISQUEMIA FOCAL	12
1.2.1. MODELOS DE ISQUEMIA FOCAL	13
2. PRINCIPIOS DE LA FOTOQUIMICA	15
2.1 PRINCIPIOS FOTOQUIMICOS y DAÑO CEREBROVASCULAR	16
2.2 CAMBIOS CELULARES POST-LESIÓN	17
2.2.1 ACTIVACION GLIAL	18
3. MUERTE CELULAR	19
3.1 NECROSIS	20
3.2 APOPTOSIS	21
3.2.1 MECANISMOS MOLECULARES DE APOPTOSIS	21
3.2.1.1 BCL-2 Y SU DISTRIBUCIÓN EN EL S.N.C.	23
4. ANATOMIA Y SISTEMA MOTOR DE LA RATA	24
4.1 MOVIMIENTO VOLUNTARIO Y CORTEZA MOTORA	27
5. DEFICITS PRODUCIDOS POR DAÑO CEREBROVASCULAR	28
6. PLASTICIDAD CEREBRAL	30
7. RECUPERACION FUNCIONAL Y SUS MECANISMOS COMPENSATORIOS	32

II. PLANTEAMIENTO	35
III. HIPÓTESIS	35
IV. MÉTODO	36
V. PROCEDIMIENTO	37
VI. RESULTADOS	45
VII. DISCUSIÓN	51
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57

## RESUMEN

Tanto en humanos como en animales se ha visto que después de un accidente cerebrovascular ocurre una gran variedad de secuelas neuroconductuales, debido a la reducción o interrupción del flujo sanguíneo, que impide el abastecimiento de oxígeno y glucosa, esenciales para mantener en equilibrio las funciones celulares. Una de éstas secuelas es la hemiplejía (incapacidad para realizar movimientos voluntarios).

En el presente trabajo se reprodujo el modelo de isquemia fototrombótica en la corteza motora de ratas provocando una hemiplejía cortical, el déficit motor se evaluó por medio de la prueba de marcha coordinada. Se analizaron los cambios morfológicos con marcadores para la proteína Bcl-2 y la expresión de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP).

El objetivo fue establecer una hemiplejía por medio de una lesión fototrombótica, comparar animales que fueron entrenadas antes y después (grupo 1, n= 9) con animales que solo fueron entrenadas antes de la lesión (grupo 2, n=8), y con un grupo control (n=7). Se utilizó un diseño experimental A-B-A. Se trabajó con ratas Wistar macho de 250 -300g.

Los resultados obtenidos muestran que es posible establecer una hemiplejía con el modelo de fototrombosis. El tamaño de lesión así como la densidad en la expresión de la proteína GFAP es mayor en el grupo 1 que en el grupo 2, sin embargo solo existen diferencias estadísticamente significativas con el grupo control ( $p < 0.001$ ). En cuanto la expresión de la proteína de Bcl-2, se observaron células marcadas en corteza cingulada, zona de penumbra, giro dentado e hipocampo. En base a los resultados obtenidos se concluye que el modelo de fototrombosis es altamente reproducible, y ofrece la ventaja de no ser un modelo tan invasivo permitiendo así una mejor aproximación a las condiciones de daño cerebrovascular en humanos.

El sistema nervioso central desempeña un papel fundamental en la regulación de todos los procesos fisiológicos y en el enlace que existe entre el organismo y el medio que le rodea. Cuando el funcionamiento es alterado por algún tipo de lesión, el sistema se modifica activando procesos que le permiten recuperarse del daño producido y de la alteración de las funciones llevadas a cabo antes de la lesión.

El grado del daño producido depende de factores como el tipo de lesión, la magnitud del área dañada, la edad del sujeto y la capacidad del organismo para recuperarse. Entre los eventos que ocurren después de una lesión rápida y repentina (v.g. traumatismo) se encuentra la ruptura de la barrera hematoencefálica (encargada de proteger al cerebro de fluctuaciones físico-químicas de la sangre y de mantener su homeostasis), dando lugar a hemorragias debido al rompimiento de vasos sanguíneos, e impidiendo así, el abastecimiento de oxígeno y glucosa. Esto a su vez da lugar a procesos de isquemia/hipoxia e hipoglicemia de la zona traumatizada. Durante las 24 hrs siguientes a la lesión, se observa necrosis celular y degeneración glial, activando a los macrófagos (células encargadas de fagocitar fragmentos de mielina y otros residuos). Algunas neuronas que se encuentran cerca de la lesión entran a procesos apoptóticos (muerte celular programada). Las células nerviosas dañadas forman una cavidad que poco a poco se ve invadida por células gliales formando así una cicatriz glial.

## **I. ISQUEMIA CEREBRAL**

El cerebro recibe su suministro de sangre de las arterias carótidas internas y de las arterias vertebrales. La arteria carótida interna entra por la base del cerebro y se ramifica en un gran número de arterias, de las cuales sobresalen dos: la arteria cerebral anterior y la arteria cerebral media. Cada una de ellas irriga la porción media y anterior de la corteza, respectivamente. Por su parte, las arterias vertebrales entran por la base del cerebro y se unen para formar la arteria basilar. Después de ramificarse en pequeñas arterias, que también irrigan el cerebelo, la arteria basilar da origen a la arteria cerebral posterior, la cual irriga el lóbulo temporal y el lóbulo occipital posterior (Kolb Y cols., 1996). Así entonces, el flujo sanguíneo que necesita el cerebro para mantenerse activo proviene de las arterias carótidas vertebrales e internas.

Es por esta vía por la que el cerebro satisface sus requerimientos de energía que provienen casi exclusivamente del metabolismo oxidativo de la glucosa y del oxígeno, ambos continuamente abastecidos por la sangre.



Cuando ocurren periodos cortos de decremento del flujo sanguíneo en el cerebro pueden dar lugar al insuficiente suministro de oxígeno y glucosa, poniendo en peligro a las células de dañarse. A este fenómeno se le conoce como isquemia cerebral, en la que hay una discrepancia temporal entre las necesidades metabólicas de las neuronas y el suministro de sangre que contiene oxígeno y otros nutrientes, que puede ser insuficiente y por tanto alterar alguna función cerebral (Toole y cols., 1990).

La reducción crítica de flujo sanguíneo puede ser clasificada en isquemia completa o incompleta. Desde un punto de vista anatómico ésta puede ser global o focal. Si bien es cierto que en ambas hay una reducción en el suministro de sangre, los eventos metabólicos que ocurren en cada una son diferentes, aunque en ambas se pueden producir dos tipos de daño celular. En el primero, el daño es suficiente para matar a las neuronas sin afectar células gliales o células vasculares. En este tipo de daño, la necrosis neuronal usualmente abarca a poblaciones neuronales selectivas, entre las que se encuentran las células piramidales del hipocampo y neocorteza, y neuronas del caudado putamen, el tálamo, y otros núcleos subcorticales (Smith y cols., 1984; Pulsinelli y cols., 1982).

En la isquemia focal, la destrucción celular es suficiente para producir una densa necrosis laminar, afectando células vasculares y gliales. En ocasiones, la duración de la isquemia determina si el daño afectará únicamente neuronas, o si progresivamente provocará micro o macroinfartos, por ejemplo en un coma hipoglucémico (si es suficientemente prolongado) se producirá atrofia cerebral y daño neuronal selectivo sin presencia de infarto y sin afectar células gliales o vasculares (Siesjö y cols., 1988).

La falta de oxígeno durante la isquemia se puede deber a la reducción o al aumento en la demanda de este. La reducción, puede ser consecuencia de alteraciones en los vasos coronarios (ateroesclerosis, trombosis, embolia, vasoespasmo o agregación plaquetaria) o de alteraciones en la presión de perfusión coronaria. Por otro lado, el incremento en la demanda se debe a la alteración de factores metabólicos.

Entre los factores metabólicos se encuentra la estimulación beta adrenérgica (catecolaminas), y el rompimiento de proteínas y lípidos, como consecuencia del incremento del influjo de  $Ca^{2+}$  a la célula. Lo cual podría afectar las funciones membranales y del citoesqueleto, causando eventualmente la muerte celular (Siesjö y cols., 1988).

Después de la interrupción total de flujo sanguíneo cerebral, casi inmediatamente hay un cese en la producción mitocondrial de ATP (adenosin trifosfato) debido a la falta de oxígeno. El rompimiento anaeróbico de glucosa conlleva a la acumulación de lactato y por tanto a una acidosis metabólica. En estudios de isquemia completa en rata, los almacenes de ATP se reducen alrededor del 90 % después de 3 minutos (Ljunggren y cols., 1974). La acumulación de lactato depende de los niveles pre-isquémicos de glucosa y glucógeno. Durante la isquemia completa se han encontrado niveles de lactato en el tejido de 12 a 13 micromoles/gramo, mientras que en un modelo de isquemia focal, con un suministro de glucosa constante, los niveles de lactato llegan a 30 micromoles/gramo (Nordstrom y cols., 1978).

Se ha propuesto que el foco de la isquemia está dividido en tres zonas, con diferentes funciones metabólicas y hemodinámicas: (1) zona central de la isquemia, en la cual puede haber de cero a un mínimo flujo sanguíneo cerebral, usualmente abajo de 10 ml/100g por minuto. (2) zona de penumbra, en ésta, el flujo sanguíneo y el metabolismo fluctúan entre condiciones adversas o favorables para la sobrevivencia del tejido, el flujo sanguíneo cerebral se encuentra abajo de 15 ml/100g por minuto, lo cual hace que el tejido de esta zona sea susceptible de infarto si llega a niveles por abajo de los 10 ml/100g por minuto. La perfusión residual de esta área suministra suficiente oxígeno para mantener concentraciones de ATP cerca de los niveles normales, pero es insuficiente para mantener bajos niveles de lactato. El metabolismo y flujo sanguíneo de la zona de penumbra, no siempre causan infarto del tejido, pero si pueden producir disfunción o daño neuronal selectivo. (3) zona colateral, en la cual el tejido se mantiene casi intacto (Welch y Barkley, 1986).

Un buen entendimiento de los procesos que ocurren en la isquemia, sobre todo en la zona de penumbra, es importante para proponer métodos y/o tratamientos que ayuden a delimitar el daño producido por la lesión. Como se puede observar dicha zona puede ser en parte la responsable de que el infarto avance o se detenga y con ello los daños funcionales que puedan estar involucrados.

### **1.1 ISQUEMIA GLOBAL**

La isquemia global usualmente es producida por una repentina y severa reducción en la presión arterial, como puede ocurrir durante un infarto al miocardio. Si esto persiste por más de 5 minutos, se produce daño cerebral, particularmente en la materia gris. Cuando hay paro cardíaco, el metabolismo y el flujo sanguíneo se reducen a la mitad. Seis horas más tarde se empieza

a elevar, creando un estado de relativa hipertermia que persiste por lo menos 60 horas. Después de un estado de coma se manifiesta el daño cerebral, aunque no persista la isquemia global. Cuando el flujo sanguíneo disminuye notoriamente se produce daño irreversible por ejemplo: la reducción a 20 ml/100g/min provoca cambios electroencefalográficos, si éste disminuye a niveles de 15 ml/100g/min ya no se pueden obtener respuestas somatosensoriales, y si los niveles decrecen hasta 10 ml/100 g/min ocurre la muerte neuronal (Toole, 1990).

### **1.1.1. Modelos experimentales de isquemia global**

Los modelos animales de isquemia, pretenden reproducir un daño similar al que se produce durante un accidente vascular cerebral en el ser humano, con el fin de estudiar los procesos de degeneración y así proponer alternativas terapéuticas. Se han descrito modelos tanto para isquemia global como para isquemia focal. En las siguientes líneas describiré más detalladamente los modelos utilizados para producir isquemia. El diagrama 1 muestra la vascularización del cerebro y algunos de los modelos descritos en las siguientes líneas, tanto para la isquemia global como para la isquemia focal.

**a) Ligadura bilateral de la arteria carótida común.** Reduce o elimina el flujo sanguíneo de ambos hemisferios, característica de isquemia global, que conduce al infarto cerebral masivo e hinchamiento cerebral (edema). La relevancia de esta aproximación es cuestionable porque no es paralela a las condiciones humanas a menos que se hable de estrangulación o manipulaciones quirúrgicas. En el humano la isquemia global es típicamente consecuencia de infarto del miocardio, hipotensión o fibrilación ventricular (Mollinari y Lauren, 1976).

Esta técnica se lleva a cabo por el aislamiento de la arteria carótida común a través de una incisión sobre la superficie ventral del cuello o garganta. Las glándulas salivales son movidas lateralmente exponiendo la arteria carótida. Tanto el nervio vago como el nervio simpático son separados de la arteria carótida común, para que ésta sea ligada transitoriamente (Karpiak y cols., 1989).

**b) Oclusión del sistema arterial vertebrobasilar por oclusión de cuatro arterias.** Pulsinelli y Brierely (1979) propusieron un modelo que involucra la oclusión bilateral temporal de la arteria carótida común junto con una oclusión bilateral permanente (por electrocauterización) de las arterias vertebrales en la rata. La coagulación de la arteria vertebral es bajo anestesia,

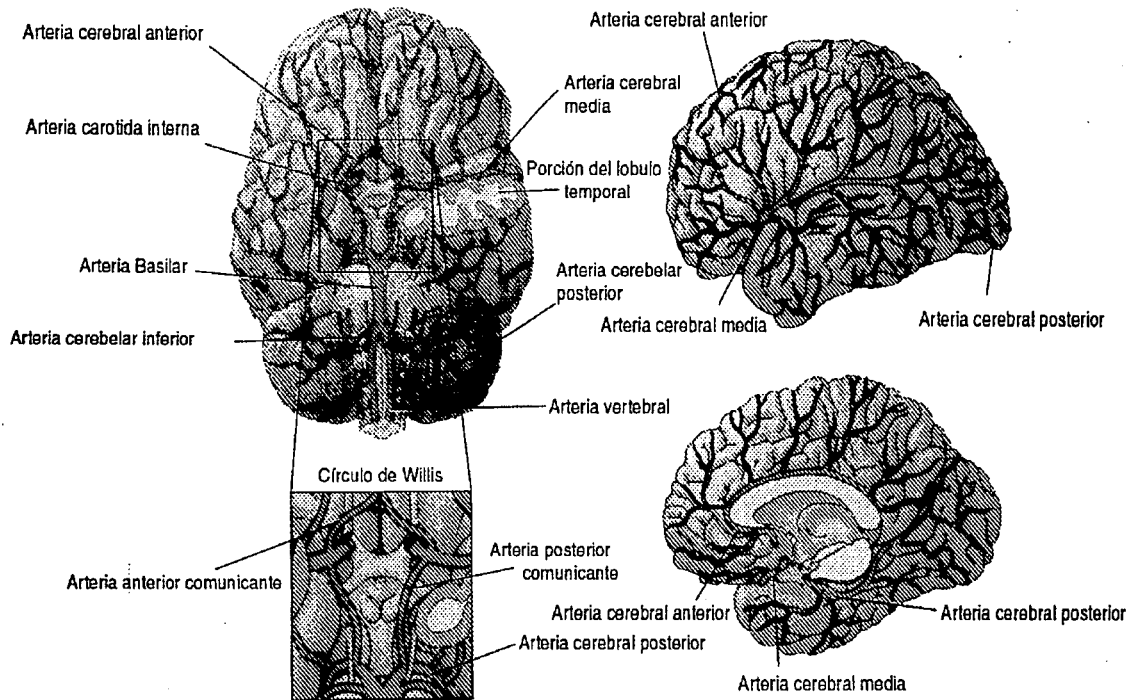


Diagrama 1. Presenta las arterias más importantes del cerebro de rata. (A) Vista ventral. (B) Vista lateral. (C) Vista mediosagital. (Tomado de Kolb, 1997 con modificaciones)

en la cual se colocan electrodos dentro del calvarium de la rata, mismo que puede ser monitoreado durante la oclusión de la arteria carótida común. Si el EEG está isoelectricamente en cero, entonces la oclusión quirúrgica de las arterias vertebrales se considera exitosa. La ocurrencia de la oclusión bilateral de la arteria vertebral en el humano es rara y el pronóstico de este tipo de isquemia generalmente es bueno.

**c) Isquemia unilateral hemisférica.** La isquemia global unilateral hemisférica puede ser realizada en roedores de Mongolia (gerbos) porque muchos (no todos) tienen incompleto el círculo de Willis (sistema vascular que comunica ambos hemisferios), lo cual permite que se realice una ligadura unilateral completa o incompleta de la arteria carótida común. Este tipo de cirugía proporciona la ventaja de que el mismo animal a quien se le aplique la cirugía funciona como su propio control (Karpiak y cols., 1989).

En los modelos antes mencionados existe un patrón de daño difuso en el cerebro, observándose muerte neuronal en zonas selectivamente vulnerables que incluyen las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo, neuronas de la corteza cerebral y las del estriado dorsolateral. Lamentablemente la extensión de la lesión en este tipo de isquemia es variable, lo cual trae serios problemas metodológicos al analizar el daño sufrido.

## 1.2 ISQUEMIA FOCAL

La progresión relativamente lenta de la isquemia focal en el cerebro está correlacionada con la eficiencia del suministro de sangre por vasos sanguíneos colaterales. En muchos aspectos la anatomía del sistema cardiovascular del humano y de las ratas son similares (Sheldon y cols., 1979), aunque, a diferencia de humano, en la rata las arterias cerebrales y las venas casi nunca viajan juntas pero se conectan a través de una compleja red de capilares; esta escasez de comunicaciones directas y la existencia de numerosas uniones entre sus ramificaciones (anastomosis) crean una considerable redundancia, haciendo más difícil producir una isquemia focal completa por oclusión de una arteria (Scremin y cols., 1995).

El daño producido por la isquemia focal no se limita al punto en el que fue producida, sino que éste se extiende a las zonas marginales (Tamamura y cols., 1981; Toole, 1990) donde se desarrolla entre las 12 y las 72 hrs subsiguientes. Por ejemplo, después de la oclusión de la arteria cerebral media, entre otras alteraciones asociadas a la isquemia, durante las primeras horas, ocurre cicatrización glial y fagocitación en la zona cerebral focal

(estriado); de 24 a 72 hrs después ocurre daño en la zona de penumbra (corteza cerebral), dos semanas después, se observan cambios en el neurópilo y degeneración en zonas alejadas de la zona central de lesión; tres meses más tarde se puede ver la propagación del daño y como resultado de ésta, atrofia del tálamo, seis meses después, hay una deformación del cerebro (Tamamura y cols. 1981).

Los Ataques de Isquemia Transitoria (TIA), que son isquemias pequeñas y de rápida disolución, dan lugar a episodios de déficit neurológico focal, secundario a un inadecuado suministro de sangre transitorio de menos de 24 hrs. de duración y que no deja secuelas. Por lo que los TIAs son reconocidos como factor de riesgo de infarto cerebral. Aunque las causas de TIAs son muchas, la más común es la arteroesclerosis. La agregación de fibrina, plaquetas o cristales de colesterol puede dar lugar a microembolias (Toole y cols., 1990).

### **1.2.1. Modelos experimentales de isquemia focal**

En cuanto a los modelos experimentales de isquemia focal, se han desarrollado distintos métodos. Algunos ofrecen grandes ventajas y semejanzas con la isquemia humana, sin embargo no todos son costeados o fáciles de reproducir. Los modelos que más se han explotado son los de roedores, debido a que su reproducción así como su manutención son económicas, estos son los más indicados para el estudio de accidentes cerebrovasculares.

**a) Oclusión de la arteria cerebral media.** La oclusión puede ser permanente o transitoria, con ayuda de electrocoaguladores o por una ligadura colocada en algún punto de la arteria (Tamamura y cols., 1981). Cuando es permanente se electrocauteriza la arteria cerebral media en la región próximal al origen de las arterias laterales lenticuloestriatales y cuando la oclusión es transitoria se colocan clips quirúrgicos o suturas en la arteria cerebral media.

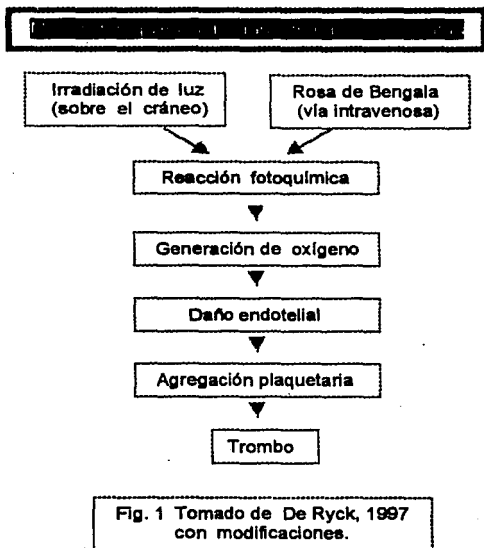
En este método se requiere hacer un trépano en el cerebro del animal experimental, localizar y manipular directamente la arteria a lesionar, con lo cual se corre el riesgo de dañar el tejido aledaño a la misma, además de que hay gran variabilidad en el sitio y extensión de la lesión dependiendo del punto donde se ocluye la arteria.

**b) Oclusión de la arteria cerebral anterior.** Aunque no es muy común que ocurra este tipo de isquemia en el humano, cuando se llega a presentar, va acompañada de pérdidas funcionales como: disfunción emocional, incontinencia urinaria, hemiplejía contralateral y/o parálisis espástica (Critchley,

1930). Se ha especulado que la falta de disfunciones neurológicas, después de una lesión de este tipo, probablemente se debe a la compensación por la vasculatura del sistema cerebral medio que permanece intacto. Esta oclusión se hace en la arteria principal más próxima al cuerpo caloso, o en alguna rama de la arteria cerebral anterior.

**c) Isquemia fototrombótica.** En este modelo de isquemia cortical fototrombótica, descrita por Watson y cols, en 1985, se han aplicado los principios de las reacciones fotoquímicas, que más adelante serán descritas. La técnica consiste, básicamente, en la reacción entre una longitud de onda determinada (550 nm) y un colorante orgánico (rosa de bengala) inyectado por vía intravenosa. La reacción se produce al irradiar una zona cerebral, a través del cráneo, con luz de 550 nm de longitud. Dicha reacción produce un daño endotelial local que activa la agregación plaquetaria que eventualmente formarán trombos (ver adelante).

Esta técnica ofrece grandes ventajas sobre el modelo de oclusión arterial ya que se trata de un método no invasivo, que permite controlar el tamaño de la lesión y se puede estudiar la histopatología y las alteraciones funcionales asociadas a la lesión de pequeñas regiones corticales. En ocasiones la isquemia cerebral es asociada a procesos trombóticos, y de ahí surge la importancia de contar con un modelo animal con un componente trombótico. Más adelante se describirá detalladamente los principios de la isquemia fotoquímica y su utilización en el modelo de isquemia fototrombótica. En la figura 1 se esquematiza la secuencia de eventos que dan lugar a la formación de un trombo por una reacción fotoquímica.



## 2. PRINCIPIOS DE LA FOTOQUIMICA

La fotoquímica estudia los efectos de la energía radiante sobre las reacciones químicas. Los átomos y moléculas absorben únicamente un cuanto (paquete de energía intercambiable) de luz, si la radiación es suficientemente grande se puede conducir a un estado de excitación de partículas y producir una disociación de las mismas.

Existen dos formas por las cuales la energía de átomos y moléculas pueden reaccionar, una es la fotoquímica y la otra es la agitación térmica. La diferencia entre las dos radica en la fuente de energía externa, en la primera es luz y en la segunda es el calor. La velocidad de la reacción térmica depende únicamente del cambio de temperatura, mientras que en la reacción fotoquímica, la velocidad se modifica al variar la intensidad de luz usada en la irradiación. En esta última el número de moléculas activadas depende de la intensidad y de la frecuencia de la luz irradiante. La concentración de las moléculas activadas será proporcional a la intensidad luminosa a la que el reactivo se haya expuesto. Con fuentes de luz suficientemente intensas, es posible lograr velocidades de reacción a temperaturas ordinarias que resultarían, sólo térmicamente, a temperaturas considerablemente elevadas (Metz, 1991).

Cuando una molécula absorbe radiación, es decir, cuando está activada, puede emitir la energía como fluorescencia o puede colisionar con otra molécula a la cual pasa su energía de excitación. En este último caso, el producto de la colisión puede ser otra partícula activada, una molécula nueva, o puede ocurrir una reacción fotosensibilizada, en la cual la molécula absorbente se disocia. En la mayoría de las reacciones fotoquímicas que comprenden moléculas, el primer paso es la disociación de alguna molécula en átomos, moléculas más simples, o radicales libres, que por interacción posterior continúan la secuencia de la reacción (Maron y Pruton, 1990).

Para medir la velocidad de una reacción fotoquímica es necesario irradiar una mezcla o compuesto químico con luz de una longitud de onda seleccionada y observar la forma en que la concentración de los reactivos varían con el tiempo. Las fuentes de luz usadas dependen del intervalo espectral que se desea usar e incluyen lámparas de filamento, arcos de carbón y metal y diversos tubos de descarga de gas. El efecto de la temperatura es muy distinto en las reacciones térmicas que en las fotoquímicas. Mientras que en la primera un incremento de 10% en la temperatura conduce generalmente a una duplicación o triplicación de la velocidad de reacción, en las segunda el mismo incremento de temperatura produce una elevación muy pequeña en la velocidad de reacción (Maron y Pruton, 1990).



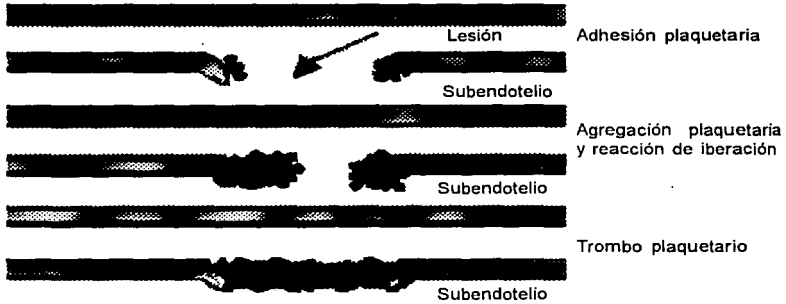


Fig. 2 Etapas de la formación del trombo plaquetario tomado de Guyton, 1995 con modificaciones.

Así, en el modelo de fototrombosis se han aprovechado estas diferencias para que la reacción producida entre el colorante orgánico rosa de bengala combinado con la sangre y la luz de 550 nm, sea exclusivamente química y no térmica.

## 2.1 PRINCIPIOS FOTOQUIMICOS Y DAÑO CEREBROVASCULAR

Las plaquetas junto con los eritrocitos y los leucocitos son elementos celulares de la sangre, miden de 2 a 3 micras aproximadamente, contienen una sustancia llamada tromboquinasa, que participa en el proceso de coagulación sanguínea. En condiciones normales, cuando la sangre circula por los vasos sanguíneos no se coagula, sólo en algunas patologías -como en un proceso de isquemia-. En el interior de los vasos se forman coágulos, denominados trombos, que obturan los vasos (fig. 2). En el proceso de coagulación participan el fibrinógeno (se encuentra en el plasma sanguíneo), la protrombina (precursor), sales de calcio y la tromboquinasa (contenida en las plaquetas). La coagulación se lleva a cabo cuando las plaquetas dejan en libertad a la tromboquinasa, la cual en presencia de sales de calcio y de algunas otras sustancias, transforman el precursor inactivo, protrombina, en precursor activo, trombina. El fibrinógeno disuelto en el plasma, se transforma por acción de la trombina en una sustancia sólida, la fibrina. Con ello, se constituye el coágulo compuesto de hilos de fibrina entrelazados, más los elementos propios de la sangre (Tatarinov, 1996).

La participación de la agregación plaquetaria es uno de los eventos iniciadores de un daño isquémico (Watson y cols., 1985; Moroni y cols., 1993; Jacobs y cols., 1996; Schiene y cols., 1996). Con el rompimiento del endotelio vascular, las plaquetas se adhieren al colágeno subendotelial expuesto en el sitio lesionado, cuando éstas son activadas se incrementa la vasoconstricción, haciendo posible la acción del fibrinógeno sobre las plaquetas, deteniendo temporalmente el flujo sanguíneo (Toole, 1990).

Después de la administración de un colorante fotosensible (rosa de bengala) se produce el daño endotelial local con la acumulación de plaquetas debida a la irradiación de luz con una longitud de onda de 550nm.

La alta especificidad de la respuesta plaquetaria es aparentemente estimulada por la discontinuidad endotelial por microruptura de la superficie luminal (Watson y cols., 1985).

El daño fotosensibilizado es inducido por la unión del rosa de bengala al endotelio, a través del cual se produce un estado de transición electrotrónico. La energía electrónica de esta transición es secuestrada en forma de oxígeno molecular reactivo en la membrana, y así se transfiere directamente a los componentes endoteliales. Una vez que se ha producido el daño por oclusión fototrombótica, la recirculación se inicia aproximadamente una hora después (Watson y cols., 1985).

## **2.2 CAMBIOS CELULARES POST-LESION**

Una lesión cerebral puede ser causada de diversas maneras, por una herida penetrante, por la ablación del tejido, por un proceso isquémico o por la realización de una cavidad de cualquier tamaño. Debido a la degeneración del tejido que rodea a la lesión hay acumulación de fluidos, e hinchamiento. La cavidad se puede expandir y después contraerse. El hinchamiento producido puede causar distorsión del tejido y que los ventrículos se expandan para compensar la pérdida del volumen.

Las células que rodean el sitio de lesión (proximales) no son las únicas que sufren las consecuencias, también hay repercusiones en las células que se encuentran alejadas de éste (distales), regularmente se trata de células que inervan la región, o que eran inervadas por las más próximas. Éstos cambios pueden provocar la muerte del tejido, por medio de un proceso llamado degeneración, obligando al organismo a reorganizar sus funciones y a activar mecanismos que le permitan adaptarse a las nuevas condiciones.

### 2.2.1 ACTIVACIÓN GLIAL

Por medio de estudios en los que se utiliza el marcado del tejido, se ha observado que el área lesionada contiene pequeñas células gliales (astrocitos y microglía) cubriendo la zona, a éste proceso se le llama *gliosis*.

Aproximadamente una hora después de iniciado el daño, el tejido que rodea la cavidad se compone por células dañadas, muertas y normales. Durante las primeras 24 hrs las células gliales (astrocitos y microglía) infiltran el área para remover los restos de tejido. durante 3 o 7 días posteriores, nuevos capilares proliferan en el área. Este proceso puede continuar por muchos meses hasta que se elimina todos los restos y solo queden las células gliales (Kolb y cols., 1996).

El papel que juegan las células gliales en el SNC después de ser lesionado, no es del todo claro. Se ha propuesto que su activación puede jugar un papel neuroprotector o neurodestructor (Stoll y cols., 1998; Chao y cols., 1995).

Uno de los mecanismos de la glía que puede ser benéfico para las neuronas después del daño es debido a su capacidad fagocítica, es decir, cuando la microglía reactiva entra en contacto con neuronas dañadas remueve las neuronas muertas y limita el crecimiento de los agentes infecciosos. Por otro lado se ha visto que los astrocitos juegan un papel crucial en el S.N.C. al mantener la homeostasis del pH y la regulación del aporte de glucosa.

Aunque los mecanismos precisos por los cuales las células gliales median el daño neural son desconocidos, se ha sugerido su habilidad para liberar sustancias neurotóxicas como: radicales libres (Involucrados en la patogénesis de la necrosis en el S.N.C.) o glutamato (neurotransmisor excitador, que aunque se sabe que su liberación mantiene funciones como la cognición, la memoria, el movimiento o las sensaciones, la liberación excesiva puede contribuir al daño neuronal (Kolb y cols., 1996).

Dado que es prácticamente inevitable que el proceso de muerte celular se active en una lesión, nos detendremos a estudiar las consecuencias y alteraciones que subyacen a ésta.

### 3. MUERTE CELULAR

Contrariamente a lo que regularmente se piensa, uno de los procesos fundamentales para la supervivencia de un organismo es: la muerte. La salud de los organismos pluricelulares, incluidos los humanos, depende no sólo de que el cuerpo sea capaz de producir nuevas células, sino también de que éstas sean capaces de autodestruirse cuando ya no son necesarias o cuando sufren una alteración, como ocurre durante un proceso isquémico, que provoca un insuficiente suministro de oxígeno y glucosa.

Anteriormente el concepto de muerte celular era concebido como patológico, específicamente en el contexto de enfermedad (Martin y cols., 1998). Ahora se sabe que la muerte celular (o la ausencia de muerte celular apropiada) tiene importancia tanto patológica como fisiológica y que existen dos mecanismos por los cuales una célula puede morir, necrosis y/o apoptosis. Estos no son mutuamente excluyentes e incluso podrían ser parte de un proceso continuo (Lennon y cols., 1991; Kunimoto, 1994). Algunas de las características diferenciales que se han descrito se encuentran en la figura 3.

CARACTERÍSTICAS	MUERTE CELULAR	
PARTICIPACIÓN CELULAR	Activa, controlada por un programa genético	Pasiva, carente de control genético
VOLUMEN CELULAR	Se reduce	Aumenta
DNA	Fragmentación internucleosomal	Fragmentación irregular
NÚCLEO	Fragmentado	Fragmentado
INTEGRIDAD MEMBRANAL	Conserva la impemeabilidad	Conserva asimetría de fosfolípidos y se pierde la integridad
ORGANULOS	Permanecen íntegros y no se fusionan con lisosomas.	Se hinchan y tienden a fusionarse con lisosomas
CITOPLASMA	Se conserva en los cuerpos apoptóticos	Se vierte en el espacio intersticial
REACCIÓN INFLAMATORIA	Ausente	Presente

Fig. 3 Características de la muerte celular apoptótica y necrótica

La activación de estos dos tipos de muerte depende de los acontecimientos que ocurran en el medio. En las siguientes líneas expondré más ampliamente algunas de las características más sobresalientes de cada una de ellas.

### **3.1 NECROSIS**

La muerte celular patológica (o accidental) es resultado de un daño extrínseco a la célula, que puede ser mediado por una perturbación medioambiental abrupta y un desajuste (osmótico, térmico, tóxico o traumático) de la condiciones fisiológicas óptimas para la célula (para una revisión, consultar Martín y cols., 1998). El proceso de necrosis involucra un rompimiento de la membrana celular y de integridad funcional de la célula y una entrada masiva de calcio y agua como consecuencia la desintegración de la célula.

Cuando el cerebro se lesiona severamente como ocurre en el traumatismo repentino o en la falta de oxígeno y glucosa como consecuencia de un accidente vascular cerebral, ocurre un proceso de muerte necrótica en el cual la célula no controla adecuadamente su balance iónico y se hincha. Hay reacción inflamatoria, es decir, infiltración de macrófagos (encargados de fagocitar) circulantes y otras células del sistema inmunitario, convergiendo en las células necróticas y fagocitándolas. Aunque esto ayuda a limitar la lesión, en ocasiones, también pueden llegar a lesionar el tejido normal de los alrededores (Ducke y cols., 1997).

Durante la necrosis, hay agregaciones de la cromatina nuclear, responsables de un oscurecimiento del núcleo o "picnosis". En ocasiones también puede observarse fragmentación nuclear. Los organelos que integran la célula, se hinchan y el volumen celular aumenta considerablemente. Estos cambios han sido asociados con alteraciones en el control osmótico, que resulta de una disminución de ATP y la consecuente disfunción de los transportadores iónicos de membrana y un incremento en la permeabilidad membranal.

Finalmente las membranas de los organelos celulares se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular, permitiendo que el contenido citoplasmático se vacíe al espacio intersticial. La muerte por necrosis generalmente va acompañada de una respuesta inflamatoria, seguida de un proceso de cicatrización que en ocasiones se asocia al desarrollo de fibrosis. Ninguno de estos cambios está determinado genéticamente y resulta, más bien, de la pérdida de la sincronización funcional entre los procesos bioquímicos y las estructuras macromoleculares que constituyen a la célula.

## 3.2 APOPTOSIS

Cuando las células mueren por un mecanismo apoptótico requieren de un gasto de energía, y a diferencia de la necrosis la célula no se hincha, se encoge y se aparta de sus vecinas, ésta generalmente ha sido definida de acuerdo a criterios morfológicos y moleculares.

En una célula normal el citoplasma está disperso y la cromatina nuclear es heterogénea, su volumen es de 90 fl aproximadamente. Cuando la célula entra a un proceso apoptótico pierde un poco de volumen y los organelos citoplasmáticos son empaquetados. En esta etapa se forman pequeñas acumulaciones de cromatina (ADN cromosómico y proteínas) y los cambios membranales que pueden conducir a la fagocitosis se hacen presentes. Al poco tiempo, la célula da la apariencia de que hierve, ya que se forman burbujas en la superficie que desaparecen al tiempo que aparecen nuevas burbujas. En este periodo la cromatina se encuentra condensada en las paredes de la envoltura nuclear, y el volumen celular ha disminuido a 70 fl. Posteriormente, el núcleo se colapsa completamente y más tarde se forman pequeñas esferas, es decir se divide. Finalmente, la célula continúa fragmentándose formando cuerpos apoptóticos que posteriormente serán fagocitados por otras células, previniendo el daño que podría resultar si se libera el contenido al espacio extracelular (Cohen y cols., 1993; Ducke y cols., 1997).

### 3.2.1 MECANISMOS MOLECULARES DE APOPTOSIS

El mecanismo de la apoptosis ha sido altamente conservado a través de la evolución animal, un ejemplo lo encontramos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* que ha sido usado para dilucidar algunos de los procesos genéticos en la vía de la muerte celular (Matsushita y cols., 1998), y en el que se han clasificado muchos de los genes esenciales para la muerte celular apoptótica.

La apoptosis puede ponerse en marcha cuando la célula deja de percibir señales químicas, como factores tróficos o de sobrevivencia, que le permiten comunicarse con otras, o cuando las células reciben órdenes contradictorias de si deben o no dividirse (Ducke y cols., 1997).

La mayoría de las células, si no todas, fabrican una serie de proteínas, que en ciertas condiciones utilizan como armas autodestructivas, éstas son las proteasas que se mantienen inactivas bajo condiciones normales y al activarse destruyen otras proteínas y con ello a la célula. Mientras la célula es útil para

el cuerpo, la maquinaria letal permanece silente, pero cuando es dañada se activa (Ducke y cols., 1997).

Por otro lado, se ha visto que la mitocondria participa en el estado efector crítico de la apoptosis. Hasta el momento se conocen tres mecanismos generales por los cuales la mitocondria interviene en la apoptosis. 1) Interrupción del transporte de electrones, fosforilación oxidativa, y producción de ATP; 2) liberación de proteínas que disparan la activación de la familia de las caspasas; y 3) alteración del potencial celular de óxido-reducción.

Una de las familias de proteínas que participan de manera importante en la activación de la apoptosis es el grupo de las cistein proteasas (enzimas encargadas de romper enlaces peptídicos de las proteínas), llamadas *caspasas*. La función de los miembros de esta familia es distinta, algunos funcionan como iniciadores del proceso de muerte y otros como efectores (responsables del rompimiento proteolítico que conduce a la célula a la desintegración). Además de que tienen la capacidad de inactivar proteínas que protegen a las células contra la apoptosis, como el caso de la Bcl-2, que más adelante será descrita. En el mamífero se han identificado 13 tipos de caspasas, y al igual que en el nemátodo tienen un papel distinto en la apoptosis y la inflamación (Pulsinelli y cols., 1982).

Existen algunas proteínas que bloquean la apoptosis, mientras que otras la promueven, la proporción entre unas y otras determinan la rapidez con que se activa la apoptosis. Se ha propuesto que la proteína Bcl-2, tiene la capacidad de inhibir la apoptosis y prolongar la sobrevivencia de las células que han activado su programa de muerte (Jaw, y cols. 1995). Cuando esta proteína se encuentra presente no se activa la maquinaria letal, por lo tanto la preservación celular es mayor, sin embargo, si una célula con gran producción de Bcl-2 se torna cancerosa, engendrará tumores más agresivos.

Muchas neuronas mueren después de un daño en el sistema nervioso como en el caso de un proceso de isquemia / hipoxia (Choi, 1990; Pulsinelli y cols., 1982), muchas al perecer por una muerte patológica (necrosis) y otras por muerte fisiológica (apoptosis). Se ha observado que la expresión de la proteína Bcl-2 se incrementa cuando se presenta un proceso de hipoxia (Jaw y cols., 1995), sugiriendo su acción protectora sobre las células afectadas por una lesión.

### **3.2.1.1 BCL-2 Y SU DISTRIBUCIÓN EN EL S.N.C.**

En el mamífero se descubrió que el proto-oncogen<sup>1</sup> bcl-2, llamado así porque fue descubierta, por primera vez, en un linfoma folicular humano (B-cell lymphoma, Tsujimoto y cols., 1986, Matsushita y cols., 1998), juega un papel importante en la regulación de la apoptosis y la necrosis (Kane y cols., 1993, 1995).

En 1988 Vaux (ver Reed, 1994) publicó el primer reporte de que Bcl-2 prolonga la supervivencia celular sin afectar la proliferación celular, es decir que Bcl-2 no promueve la generación de tumores. A partir de este estudio surgieron otros estudios en los cuales se demuestra que Bcl-2 participa activamente inhibiendo la apoptosis durante el desarrollo (Oppenheim y cols., 1991; Martinou y cols., 1994; Ferrer y cols., 1994); o en respuesta a una gran cantidad de estímulos tóxicos incluyendo el factor de necrosis tumoral, irradiación con rayos gama, agentes quimioterapéuticos; o durante otros procesos patológicos (Gillardon y cols., 1994; Graham y cols., 1996) como la isquemia (Linnik y cols., 1993; Shimnsaky y cols., 1994; Chen y cols., 1995; Hara y cols., 1996; Gillardon y cols., 1994; Honkaniemi y cols., 1996; Clark y cols., 1997; Ferrer y cols., 1998; Isenmann y cols., 1998).

Martinou y cols. (1994) realizaron una serie de experimentos en los que comprobaron que los ratones transgénicos (alterados genéticamente) que sobreexpresan la proteína Bcl-2 durante el desarrollo del sistema nervioso, periodo en el que hay una gran pérdida neuronal, incrementa la supervivencia de células en un 40% o 50% más en comparación con ratones que no sobreexpresaron la proteína.

Los mecanismos por los cuales Bcl-2 protege a las células de la muerte son aún desconocidos. Sin embargo se ha visto que esta proteína se encuentra asociada a la mitocondria, al retículo endoplásmico y a la membrana nuclear (para una revisión, consulte Reed, 1994; Hockenberry y cols., 1993; Merry y cols., 1997), probablemente regulando un proceso celular generalizado como la generación de radicales libres (Kane y cols., 1993, 1995) o de vías antioxidantes, y por tanto suprimiendo la producción de especies reactivas de oxígeno, la peroxidación lipídica y afectando la regulación de los niveles de calcio intracelular (Kane y cols., 1993).

La distribución detallada de Bcl-2 en el Sistema Nervioso ha sido estudiada tanto a nivel de ARN (Jaw y cols., 1995; Ashai y cols., 1997; Clark y cols., 1997) como a nivel de la expresión de la proteína (Chen y cols., 1995; Ferrer y



cols., 1998). Ambos se han localizado durante el desarrollo embrionario y en muchas áreas del cerebro. Durante el desarrollo del ratón, la proteína se ha encontrado en células en división de las zonas ventriculares, y en diferentes neuronas, notablemente en el desarrollo cortical. Postnatalmente, los niveles decrentan en muchas regiones del cerebro, excepto en neuronas que continúan con neurogénesis postnatal, como la corteza cerebelosa, el hipocampo, y el bulbo olfatorio. En el cerebro adulto, la expresión de la proteína es muy baja, a menos que haya estímulos que la susciten (González García y cols., 1995).

A pesar de que Hockenberry y cols., en 1991, demostraron que Bcl-2 sólo se expresaba en neuronas y no en glía, recientemente se ha visto que, en el adulto, la proteína se expresa tanto en glía (Chen y cols., 1995) como en neuronas (Clark y cols., 1997; Ferrer y cols., 1998). Especialmente se expresa en células de larga vida, como linfocitos B y neuronas sensoriales periféricas. Además se ha visto que Bcl-2 contribuye a la supervivencia de neuronas simpáticas, células cerebelosas y células de la sustancia nigra (Hockenberry y cols., 1991).

#### **4. ANATOMIA Y SISTEMA MOTOR DE LA RATA**

El sistema motor está dividido en subsistemas (fig. 4), organizados de tal forma que desde allí se pueden controlar diferencialmente los movimientos del cuerpo. Algunos animales se pueden mover únicamente con movimientos gruesos, mientras que otros, como el ser humano, los primates o las ratas cuentan con la capacidad de mover partes específicas de su cuerpo (movimiento fino) por medio de la coordinación de sus extremidades y dedos que les permite, entre otras cosas, tomar y manipular objetos. Los componentes de cada uno de los subsistemas que lo integran están organizados jerárquicamente, pero también funcionan en paralelo y comparten muchas interconexiones (Kolb y cols., 1996) formando un ensamblaje neuronal responsable del control del movimiento.

Cada subsistema tiene una aportación única para el control motor. El primer circuito se encuentra en la materia gris de la médula espinal, compuesto por interneuronas y motoneuronas alfa, que envían sus axones fuera de la médula espinal e inervan fibras del músculo esquelético.

En este circuito la médula espinal realiza tres funciones importantes: contiene los circuitos necesarios para la ejecución de reflejos, contiene programas para producir movimientos complejos y transmite la información entre el cuerpo y el cerebro. Está subdividida en dos zonas: materia blanca

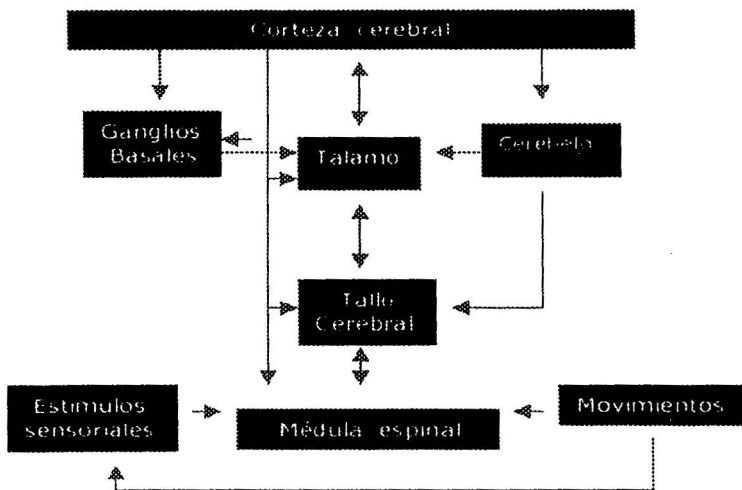


Fig 4 Diagrama de la organización del sistema motor mostrando sus estructuras y conexiones más importantes. Tomado de Kolb con modificaciones, 1996.

(externa) y materia gris (interna), y a su vez la materia gris se compone de dos áreas: columna ventral (contiene principalmente células motoras) y columna dorsal (contiene principalmente células sensoriales).

El segundo subsistema lo integran neuronas cuyos somas se encuentran en la corteza motora y en el tallo cerebral. Los axones de estas neuronas motoras superiores descienden y hacen sinapsis con interneuronas y/o con motoneuronas alfa en la médula espinal. La vía descendente es esencial para el control del movimiento voluntario y es la unión entre los pensamientos y las acciones. Las proyecciones descendentes de áreas corticales del lóbulo frontal, incluyendo el área 4 de Brodman (corteza motora primaria), área 6 (corteza premotora), y la corteza motora suplementaria son esenciales para la planeación, iniciación y la dirección del movimiento voluntario. La influencia de estas áreas corticales son llevadas directamente al circuito de la médula espinal por la vía corticoespinal e indirectamente por las proyecciones al tallo cerebral, mismas que también serán proyectadas a la médula espinal (Purves

y cols., 1997; Kolb y cols., 1996).

El tercer subsistema es el cerebelo. Está implicado en la iniciación, coordinación y corrección del movimiento por medio de la comparación que hace entre la información proveniente de la corteza y el tallo cerebral con la información sensorial que recibe de los movimientos que ejecuta el cuerpo en ese momento (Kolb y cols., 1996).

El cuarto subsistema son los ganglios basales que es un grupo de estructuras (constituido por el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido) encargadas de la iniciación del movimiento propiamente dicho. El núcleo caudado y el putamen constituyen al cuerpo estriado, que está principalmente relacionado con la regulación de la rapidez de los movimientos. Otra estructura que juega un papel importante en la regulación del movimiento es el tálamo, que constituye la interfase del cerebelo y ganglios basales a las regiones corticales (Kolb, 1996).

De manera general he descrito *grosso modo* las vías y estructuras encargadas del movimiento, sin embargo, el tema que nos atañe en este momento es específicamente el control del movimiento voluntario, por lo cual en el siguiente apartado me enfocaré a la descripción de una de las estructuras que está involucrada directamente con esta función.

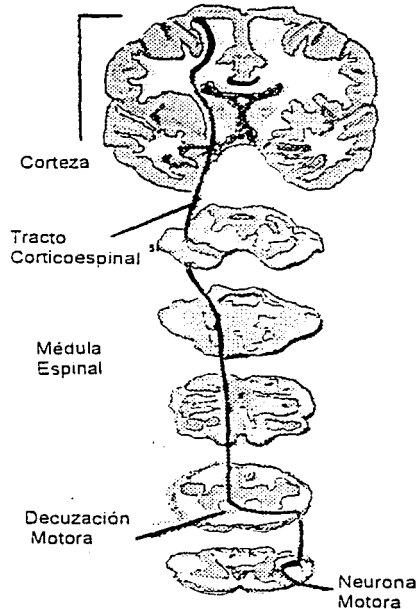


Fig. 5 Vía del Sistema motor  
Tomado de Kandel, 1995. Con modificaciones

#### 4.1 MOVIMIENTO VOLUNTARIO Y CORTEZA MOTORA

Una de las principales funciones de los sistemas sensoriales es guiar los movimientos que constituyen nuestro repertorio conductual a través de la representación interna del mundo exterior. Los movimientos están controlados por los sistemas motores del encéfalo y la médula espinal, gracias a los cuales podemos mantener la postura y el equilibrio, mover el cuerpo, las extremidades, los ojos y comunicarnos mediante el habla y los gestos.

Existen tres categorías distintas de movimientos: los reflejos (respuestas no planeadas, estereotipadas y rápidas); los patrones motores rítmicos (se planean, pero una vez iniciados se reproducen automáticamente 'correr'); y el movimiento voluntario, tema en el que me centraré en los siguientes párrafos, así como en el papel que juega la corteza cerebral en éste.

En primer lugar, el movimiento voluntario se planifica de acuerdo con los objetivos del movimiento; y en segundo lugar, este movimiento se modula según las características concretas de las circunstancias. Este tipo de movimiento se caracteriza por dos rasgos: son propositivos (dirigidos a una meta) y en gran parte son aprendidos (su ejecución tiende a mejorar con la práctica; Kolb y cols., 1995).

Ya he descrito que la médula espinal, el tallo cerebral, el cerebelo y los ganglios basales, participan en la planeación, generación, y ejecución de los movimientos. Sin embargo, si los movimientos solo estuvieran dirigidos por estas estructuras, tenderían a ser movimientos estereotipados. Por lo cual, la participación de la corteza cerebral es esencial para que se realicen movimientos voluntarios, ya que contribuye en gran parte a organizar todos los detalles de los movimientos.

La corteza cerebral está dividida en mapas topográficos. En la fig. 6 se muestra la división de la corteza cerebral de rata. En los mamíferos se distinguen principalmente tres áreas: 1. Área motora primaria, relacionada con el inicio del movimiento, sus neuronas reciben información acerca de la posición y velocidad de los movimientos a través de los sistemas sensoriales y propioceptivos de los músculos que controlan. Esta información se transmite desde la corteza somatosensorial y desde conexiones talámicas directas hacia la corteza motora primaria.

2. Área premotora, juega un papel esencial en la planificación de los movimientos dirigidos a la meta. Cuando se presenta algún tipo de lesión

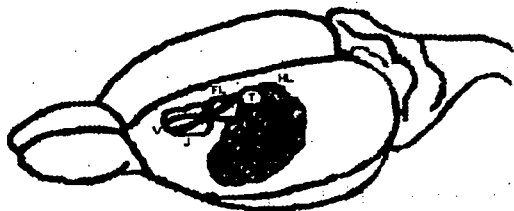


Fig. 6 Topografía de la corteza motora  
 Las líneas sólidas delimitan las zonas de vibrissas (V), labio y lengua (J),  
 extremidad anterior (FL), tronco (T) y extremidad posterior (HL).

en la corteza premotora, se pierde la capacidad para desarrollar una estrategia de movimiento adecuado. Esta zona recibe su principal *input* de la corteza parietal posterior y a su vez proyecta a la corteza motora primaria. También envía conexiones a las regiones troncoencefálicas y a la región de la médula espinal que controla los músculos proximales y axiales.

3. Área suplementaria, la actividad de las neuronas de esta área está ligada a la actividad mental necesaria para planificar y programar secuencias complejas movimientos, aún cuando solo se ensayan mentalmente y no se ejecutan. Esta área junto con el área premotora están organizadas somatotópicamente. Sus neuronas proyectan a la corteza motora primaria, estructuras subcorticales y a la médula espinal (Kolb y Whishaw, 1996).

## 5. DEFICITS PRODUCIDOS POR DAÑO CEREBROVASCULAR

En humanos, se ha visto que después de un accidente cerebrovascular una gran variedad de secuelas neuroconductuales frecuentemente se presentan debidas al daño isquémico. Estas pueden ser recuperadas a diferentes velocidades de acuerdo a los programas terapéuticos a que sea sometido el paciente (Perry, 1983).

Las manifestaciones clínicas asociadas a procesos de isquemia son determinadas por el tamaño, la localización y la duración del infarto, además de ser modificadas, ya sea a favor o en contra, por las circunstancias que se presentan durante el periodo post-isquémico. Los síntomas que se presentan, después del daño, van desde pérdida de la visión, mareo, vértigo o convulsiones

hasta pérdida de la conciencia. Incluyendo otras manifestaciones de disfunciones físicas o mentales como: la amnesia, el delirio, la demencia, problemas del lenguaje, temblores, pérdida de coordinación, parálisis parcial o espasticidad y hemiplejía.

En particular me enfocaré a describir una de estas disfunciones físicas que subyacen al daño cerebrovascular: la **hemiplejía**. Esta es una incapacidad para realizar movimientos voluntarios, debida al aumento o disminución del tono muscular, dando un aspecto de espasticidad o de flacidez total. Se afecta solo una parte del cuerpo, contralateral a la lesión (como sucede en lesiones de corteza motora), tanto en las extremidades superiores como en las inferiores.

Ya en 1870, Fritsch y Hitzig (en Kolb, 1996) proporcionaron la primera evidencia de que distintas áreas del encéfalo controlan movimientos de la parte contralateral del cuerpo. El área que describieron corresponde al área 4 de Brodmann y en la actualidad se le denomina corteza motora primaria. Posteriormente se describieron otras áreas de la corteza involucradas en el control del movimiento, y se dieron cuenta que algunas lesiones en estas zonas de la corteza podían provocar debilidad de la cara, los brazos o las piernas.

En algunos casos, dependiendo del grado de lesión, la recuperación del movimiento es buena, pero en otros permanecen secuelas funcionales. Desde 1915 Franz y cols. reportaron que es más frecuente que se afecte el control voluntario de las partes más distales que de las partes más próximas de un miembro.

Los adultos hemipléjicos, presentan un incremento en la flacidez o en la rigidez de los movimientos al ritmo que progresa el proceso de la lesión (Bach-y-Rita, 1980). Sin embargo, cuando una lesión cerebral provoca hemiplejía, las funciones pueden ser recuperadas una vez que los síntomas agudos asociados como hemorragia, embolia o trauma cerebral desaparecen. Aunque la velocidad de la recuperación del uso de alguna extremidad paralizada, después de un traumatismo agudo, se realiza durante las primeras semanas, también se observan pequeños cambios después de algunos años.

En los humanos se ha observado que la recuperación de la habilidad perdida depende, en algunas ocasiones, de características individuales en donde entra en juego la recuperación adaptativa (v.g. adquisición de

nuevas estrategias para realizar la función), y en otras ocasiones depende de la recuperación intrínseca que con el paso del tiempo adquiere el organismo.

Muchas teorías se han propuesto para explicar la recuperación y la adaptabilidad de los individuos después de un accidente, así como los mecanismos que explican la adaptación ante tales cambios. Algunas de éstas teorías se describen en el siguiente apartado.

## **6. PLASTICIDAD CEREBRAL**

Como ya se mencionó después de un accidente cerebrovascular, pueden permanecer secuelas neuroconductuales que podrían traer consigo terribles consecuencias en la vida de una persona. El traumatismo es una de las causas que provocan que casi la mitad de las hospitalizaciones sea por discapacidad neurológica y es la causa de aproximadamente el 10% de todas las muertes (Kolb y cols., 1996). Es por esto entre otras razones que muchas investigaciones se han enfocado en las alteraciones cerebrales que se producen y la forma en que se pueden revertir.

Cuando el cerebro es víctima de accidentes traumáticos y como consecuencia surge la hemiplejía, no únicamente ocurre la desorganización de los patrones normales de estabilidad y movilidad corporal (cambios conductuales), o de información retroalimentadora aberrante (movimientos repetitivos mal ejecutados). También se lleva a cabo la adaptación del sistema nervioso a los movimientos no esenciales o irrelevantes para realizar la tarea y la percepción errónea para inhibir la movilidad mientras el organismo intenta ganar estabilidad (Bach-Rita, 1980).

La capacidad del sistema nervioso para cambiar (frecuentemente llamada plasticidad neural) es especialmente notable durante el desarrollo. Sin embargo, la habilidad para aprender nuevas tareas y establecer nuevas memorias continúa a lo largo de la vida. Se han planteado tres formas de plasticidad: 1) durante el desarrollo; 2) en la recuperación funcional; y 3) durante procesos de aprendizaje y memoria. La plasticidad que se observa durante el desarrollo y durante la recuperación funcional requiere de diferentes lapsos para ser expresada, a diferencia de la plasticidad que se observa durante el aprendizaje y la memoria que puede ser dada en cuestión de minutos.

El término de plasticidad cerebral tiene diferentes conotaciones,

dependiendo del contexto en que haya sido definido. Así, en estudios de la plasticidad sináptica, ésta se define como cambios a largo plazo en la potencialidad sináptica resultado de cambios transcendentales en la actividad sináptica. Mientras que la plasticidad neuronal o neuroplasticidad está basada en términos de sobrevivencia asociados a los cambios relacionados con el número y la eficiencia de las conexiones sinápticas. Este concepto incluye mecanismos complejos que involucran la participación de sustancias neurotróficas y de moléculas de adhesión celular (Cesaro, 1996); por otro lado, la plasticidad del comportamiento se puede decir que es un cambio significativo de la conducta, es un proceso caracterizado por cambios adaptativos estructurales y funcionales del sistema nervioso, que se efectúan como consecuencia de su alteración durante la ontogenia o durante procesos patológicos (Brailowsky y cols., 1991).



Fig. 7 Cambios funcionales en la corteza somatosensorial de un mono después de la amputación de un dígito. El mapa cambió sustancialmente, las neuronas que antes respondían a la estimulación del dígito 3 ahora responden a la estimulación del dígito 2 y 4.

Descubrimientos en el sistema sensorial somático y en el sistema visual, indican que algunos aspectos mínimos de los circuitos neuronales, como el tamaño y la distribución de los campos receptivos, pueden cambiar ante circunstancias especiales. Sin embargo, el significado funcional de éste reacomodo no es claro, lo que ha llegado a dar la apariencia de que algún grado de reorganización cortical es posible en la vida adulta de los organismos (Purves y cols., 1997).

Una aproximación a la plasticidad cortical en adultos ha sido examinar la maleabilidad de los mapas sensoriales somáticos, por medio del mapeo topográfico de la corteza sensorial somática, con ayuda de microelectrodos colocados en la corteza para determinar los campos receptivos de las



neuronas corticales (fig. 7). En dichos experimentos se ha observado que meses más tarde después de haber cortado alguno de los dedos de la mano del mono, las neuronas de la región cortical que pertenecían al dedo amputado, respondían a la estimulación de alguno de los dedos adyacentes intactos (Nudo y cols., 1996, a y b; Merzenich y cols., 1984).

Experimentos posteriores mostraron que el reacomodo del mapa somatotópico no necesariamente requiere de la amputación de algún miembro. Si los monos son entrenados para usar un dígito específico para una tarea particular, que es repetida en muchas ocasiones, la representación funcional del dígito entrenado se expande a expensas de otros dígitos (Purves y cols., 1997).

Los cambios sinápticos pueden ocurrir en períodos cortos de tiempo (segundos-minutos), promueven rápidas y pasajeras modificaciones basadas en la modificación de los niveles de calcio y otros segundos mensajeros disparando eventos celulares, que incluyen la fosforilación de proteínas y cambios en la expresión genética, que eventualmente podrían conducir a cambios sinápticos permanentes. Otros mecanismos pueden causar el cambio en las conexiones pre y post-sinápticas, incluyendo el incremento o decremento de la liberación de transmisores desde las terminales presinápticas, el cambio en el número de receptores post-sinápticos, y agregando (o substrayendo) sinapsis en los circuitos relevantes. Diferentes regiones cerebrales usan una o más de éstas estrategias para aprender nuevas conductas y adquirir nuevas memorias. Sin embargo, como los cambios sinápticos no son en sí mismos aprendizaje o memoria, éstos proveen el substrato para éste fenómeno (Purves y cols., 1997).

## **7. RECUPERACION FUNCIONAL Y SUS MECANISMOS COMPENSATORIOS**

Al hablar de recuperación funcional al mismo tiempo se alude a la plasticidad cerebral, es decir, a la capacidad que tiene el cerebro para cambiar y/o readaptarse a las nuevas condiciones en las que se encuentra, después de que éstas fueron alteradas. La plasticidad es especialmente visible durante el desarrollo, sin embargo, la habilidad para aprender o modificar nuevas tareas continúa a lo largo de la vida (Bach-Rita, 1980). La pregunta es ¿cómo hace el SN para mediar éstos cambios?.

Dentro de los mecanismos que se han propuesto para explicar cómo se organiza el tejido que sobrevive a una lesión, para recuperar las funciones perdidas (su plasticidad), se encuentra la *sinaptogénesis reactiva*. Esta consiste

en el restablecimiento de las sinapsis de las neuronas parcialmente denervadas, por aferentes íntegras diferentes de las lesionadas, que forman parte de las aferencias habituales del grupo celular afectado (neuronas blanco). Otros mecanismos propuestos son el *rebrote (sprouting) regenerativo*, que consiste en el crecimiento axónico o dendrítico desde las vías aferentes lesionadas, en dirección a sus células blanco habituales, y el *desenmascaramiento de aferentes silenciosas*. Las vías enmascaradas que no se utilizan normalmente en una función en particular, pueden participar como auxiliares cuando el sistema falla, aunque también se contempla la posibilidad de que aquellas vías que no estaban involucradas inicialmente en la función en particular, por medio del entrenamiento adquieran un nuevo papel funcional (Bach-Rita, 1980).

En los humanos la recuperación después de una lesión ocurre en unos cuantos días o semanas y sigue una secuencia relativamente ordenada. Algunos pacientes recuperan casi completamente el uso normal de sus extremidades; pero en otros, la recuperación se queda en alguna de las fases de recuperación por las que atraviesan aquellos sujetos que regresan casi a la normalidad. La completa recuperación del uso de las extremidades, aparece entre los 23 y los 40 días después de la lesión (Kolb y Whishaw, 1996). Éstos datos se pueden comparar con los estudios en ratas que se han reportado, en donde éstas tardan aproximadamente 30 días en recuperarse (Brailowsky y cols., 1986).

En la rata la recuperación del daño producido en la corteza motora, después de una lesión isquémica, ocurre en una secuencia de los procesos más elementales a los más complejos: (1) reaparición del reflejo; (2) rigidez; (3) aparición de la conducta de agarre que puede ser facilitada por otros movimientos o como parte de otros movimientos; (4) evolución del reflejo de agarre voluntario (primero los músculos flexores y después los músculos extensores). El agarre voluntario continúa mejorando hasta que se lleva a cabo el movimiento independiente de los dedos.

Las teorías propuestas para explicar la recuperación funcional son diversas, y han ido cambiando conforme se avanza en el conocimiento del funcionamiento del cerebro a través de nuevas tecnologías y técnicas de estudio. Algunas de ellas abordaban el problema desde un punto de vista globalista, como en el caso de la teoría de acción de masas o de equipotencialidad propuesta por Lashley (1929), en la cual se asumía que la corteza cerebral funcionaba como un todo indiferenciado, en el que la pérdida y el grado de permanencia temporal de una función dependía de la extensión de la masa cerebral dañada (Kolb y Whishaw 1996). Otras teorías,

partían de un punto de vista puramente localizacionista, como el caso de la teoría de la sustitución, propuesta por Munk en 1881, quien postuló que las estructuras intactas restauran la función del área dañada. En ésta teoría se partía del hecho de que cada área cortical poseía una función específica, y que por tanto, cualquier lesión crearía la pérdida irreversible de la función; sin embargo, la recuperación funcional se podía dar a través de las áreas no afectadas por dicha lesión.

En la teoría de la *jerarquía funcional*, propuesta por Jackson, se postula que el SNC puede funcionar simultáneamente como un todo y con funciones específicas. Cada función puede estar representada en varios niveles de organización (cortical o subcortical), en donde los niveles más altos controlan los niveles más bajos por medio de mecanismos desarrollados en el curso de la ontogenia del individuo. En esta teoría también se postula el principio de *compensación*, en el cual se considera que cuando una función, controlada por los niveles superiores, se pierde, los niveles inferiores se activan y retoman (total o parcialmente) la función de los superiores.

Muchas teorías se basan en el principio de compensación partiendo de diferentes planteamientos. El desarrollo de *estrategias alternativas* por parte del individuo, le permite efectuar la misma conducta por diferentes medios, que difieren mucho de los que utilizan los individuos intactos. Algunos neurólogos y psicólogos han argumentado que en muchos casos la recuperación conductual puede ser atribuida a las estrategias compensatorias más que a la recuperación en sí. Sin embargo, existen modelos que correlacionan la plasticidad neuronal con la recuperación conductual, que consideran que fenómenos plásticos dentro de la misma estructura dañada sean los responsables de la recuperación.

Es probable que la recuperación de un desajuste conductual después de sufrir un daño dependa de las neuronas intactas que normalmente contribuyen a dicha conducta. Esta sería entonces una función *redundante* del SN, es decir, que el SN tiene la capacidad de que después de una lesión, aún la parte más pequeña de tejido remanente puede asumir la mayor parte de los aspectos de la función inicial (Almli y Finger, 1988). Esta redundancia puede ser (a) el resultado de una representación jerárquica de la función a diferentes niveles, o (b) porque las neuronas involucradas en una función específica están distribuidas equitativamente en todas las regiones de una estructura cerebral en particular (corteza cerebral).

## PLANTEAMIENTO

En el presente trabajo se reprodujo el modelo de isquemia fototrombótica descrito por Watson y cols., en 1985. Debido a que la lesión producida con este modelo es a nivel de corteza, se produjo una hemiplejía cortical en ratas por medio de una fototrombosis.

El modelo de hemiplejía cortical ha sido antes desarrollado por ablación de corteza motora y por infusión crónica y continua de GABA (ácido gama aminobutírico, principal neurotransmisor inhibitor) en la corteza motora (Brailowsky y cols., 1991). Ambos utilizan técnicas invasivas que requieren una manipulación directa y realmente traumática del cerebro, a diferencia del modelo de fototrombosis que no requiere de la manipulación directa del cerebro de la rata, y sobre todo que tiene un mayor acercamiento con la realidad.

Una vez establecido y llevado a cabo el modelo de fototrombosis, se evaluó el déficit motor de los sujetos experimentales, por medio de la prueba de marcha coordinada, la cual ya ha sido utilizada en los dos modelos de hemiplejía antes descritos. Finalmente se analizó la expresión de la proteína Bcl-2 y la expresión de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) en la zona lesionada de tejido cerebral.

## HIPÓTESIS

- Una lesión isquémica inducida fotoquímicamente a nivel de corteza motora es capaz de producir hemiplejía.
- La isquemia inducida fotoquímicamente produce muerte neuronal en la zona isquémica, e incrementa la expresión de la proteína Bcl-2 en las células sobrevivientes en la zona de penumbra adyacente a la lesión, y posiblemente en regiones cerebrales más alejadas del centro isquémico como pueden ser zonas de proyección como el tálamo.
- Las ratas que recibieron entrenamiento post-lesión posiblemente presentarán mayor inmunoreactividad a Bcl-2.
- La isquemia inducida fotoquímicamente incrementa la expresión de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP), en la región lesionada y posiblemente en regiones más alejadas de la zona isquémica como pueden ser zonas de proyección como el tálamo.

## MÉTODO

### SUJETOS

Se trabajó con tres grupos de ratas Wistar macho de 250-300 g: 2 experimentales y uno control: (a) con entrenamiento pre y post-lesión (n=9), (b) con entrenamiento pre-lesión (n=8), y (9) uno control (n=7). Proporcionadas por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se instalaron en cajas de acrílico de 51.5 x 40.5 x 21 cm. a temperatura ambiente y a un ciclo de luz-oscuridad 12:12, con libre acceso a comida y a agua. Las ratas fueron entrenadas y evaluadas en el transcurso de la mañana.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental A-B-A, con tres grupos de trabajo (1 testigo y 2 experimentales)

#### GRUPO EXPERIMENTAL 1

Entrenamiento pre-lesión – Lesión (rosa de bengala + exposición a luz)–  
Entrenamiento post-lesión – Sacrificio – Inmunohistoquímica

#### GRUPO EXPERIMENTAL 2

Entrenamiento pre-lesión – Lesión (rosa de bengala + exposición a luz)  
– Sacrificio - Inmunohistoquímica

#### GRUPO CONTROL O TESTIGO

Entrenamiento pre-lesión – Lesión falsa (Inyección salina .9% + exposición a luz)– Entrenamiento post-lesión – Sacrificio – Inmunohistoquímica

### MATERIAL

- Lámpara con un foco Phoenix de 130 V – 75 Watts y longitud de onda de 550-570 nm. Provista de ventiladores con el fin de establecer un flujo de aire, evitando su sobre calentamiento y el incremento de la temperatura sobre el cráneo del animal, soportada por una estructura de metal colocada verticalmente.
- Estereotáxico
- Colorante orgánico rosa de bengala, con una máxima absorbancia de 560 nm.
- Barra de madera de 2.5 cm. X 2 m. de largo
- Anticuerpos anti-GFAP (poli-clonal) y anti-Bcl-2 (poli-clonal)

## PROCEDIMIENTO

Como se ha descrito a lo largo del presente trabajo el primer paso fue reproducir el modelo de isquemia fototrombótica descrito por Watson y cols., en 1985. Debido a que el laboratorio en el que se realizaron los experimentos no contaba con dicho modelo, fue necesario hacer una búsqueda de los materiales que podrían ser útiles para desarrollar un sistema en el que pudiera reproducir los resultados obtenidos por Watson.

En primer lugar se buscó, dentro de las marcas comerciales, un foco que emitiera una luz con las características deseadas (560 nm de longitud de onda). Con la ayuda del físico Arturo Nogueira del Instituto de Instrumentación de la UNAM, se midió la longitud de onda de varios focos, así como su intensidad (watts). Es importante resaltar que la intensidad debía ser controlada debido a que el tipo de lesión que se buscaba era tipo fotoquímica no térmica.

El foco ideal fue: Phoenix de 130 V y 75 Watts, con una longitud de onda de 550 a 570 nm. Dado que su intensidad aún estaba por encima del nivel permitido para el experimento, el problema se solucionó alejando el punto de iluminación del cráneo del animal durante la cirugía.

El segundo paso fue el desarrollo de un soporte que permitiera dirigir la irradiación al punto deseado, es decir, a la corteza motora de la rata. Para lo cual se implementó una caja de lámina de aluminio plateado (fig. 8) con un orificio en la cara opuesta a la del foco, que permitió el paso de la luz hacia el animal. Además se colocó, sobre el cráneo de la rata, una placa de metal con un orificio central de 6 X 4 mm para delimitar la zona irradiada. La caja fue montada, sobre un soporte de metal.

Para evitar el calentamiento se colocó un ventilador en dirección a la zona irradiada, y un termómetro sobre la placa de metal. La temperatura se mantuvo constante 37°C.

El modelo fue previamente evaluado en ratas que eran lesionadas de la misma manera que las que se utilizaron en este estudio. En estas se inyectaron varias dosis y concentraciones del colorante rosa de bengala, así como diferentes tiempos de exposición a la luz. Finalmente, en base a los resultados obtenidos en diferentes grupos de ratas, se determinó inyectar 0.133 ml por cada 100 gr de peso de la rata de colorante rosa de bengala,

Estereotáxico



Fig. 8. Rata en cirugía.

de una solución patrón de 30 mg/ml disuelta en salina 0.9% por medio de una bomba de infusión, y un tiempo de irradiación de 30 minutos.

Para comprobar que se había producido una isquemia de tipo trombótico, al final de la cirugía las ratas usadas para validar el modelo fueron perfundidas con paraformaldehído y teñidas con Nissl para comprobar que se había producido una zona de lesión bien delimitada.

Se descartó la posibilidad de que la lesión fuera térmica con la utilización de otro grupo de prueba que fue sometido a la exposición de luz durante 30 minutos sin la inyección del colorante rosa de bengala. Los resultados demostraron que éstas ratas no tenían ninguna alteración en el tejido por la exposición, es decir, el daño isquémico solo se produce con la interacción que hay entre el colorante y la luz de 560 nm.

Una vez desarrollado el modelo de fototrombosis, se procedió al siguiente paso de la investigación, que consistió en la evaluación del déficit motor, producto de la lesión fototrombótica en la corteza motora. Se utilizó la escala de déficit motor de Simon Brailowsky. En los siguientes párrafos se explica más ampliamente.

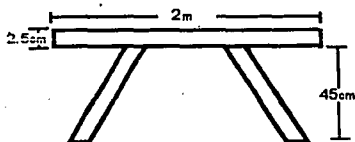
### **Habitación y entrenamiento.**

El método seleccionado para medir el déficit motor es una prueba que requiere de la coordinación motora, que consiste en hacer caminar a la rata sobre una barra de 2.5 cm x 2 m de largo (colocada horizontalmente). Maier (1935) desarrolló dicha prueba, que posteriormente fue modificada y utilizada por Brailowsky y cols.(1986), de quien se retoma en el presente trabajo.

Durante los primeros ensayos la rata es sometida a un procedimiento de habituación, con el fin de eliminar variables extrañas que interfieran con su ejecución normal. La manipulación que se llevó a cabo durante los primeros tres días del experimento, consistió en manipular manualmente a la rata y registrar su peso. El peso fue tomado al inicio de la sesión en cada uno de los sujetos.

En el cuarto día de la habituación, la rata fue colocada (por dos ensayos) en un extremo de la barra, a una distancia cercana a su caja, de tal forma que después de haber caminado sobre la barra se introdujera a su caja habitación. En el quinto y sexto día la rata fue colocada en la





Barra de entrenamiento

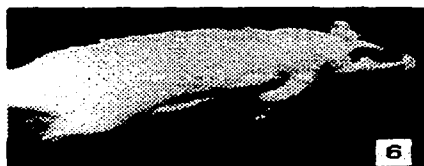
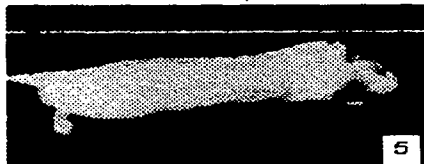


Fig. 9 Escala utilizada para evaluar el déficit conductual en ratas.  
Tomado de Brailowsky y cols., 1986 (con modificaciones)

misma posición, pero a una distancia más retirada de su caja, induciéndola así a caminar una longitud mayor de la barra, hasta lograr correr a lo largo de toda la barra, es decir, la rata se colocó en el cm 0 de la longitud de la barra y la caja donde habita en el cm 200.

Del 7º al 13º día se llevó a cabo la línea base del experimento, en la cual, se registró, peso, tiempo de recorrido y déficit.

El déficit fue medido de acuerdo a la eficiencia de ejecución de la rata. Esta fue puntuada cada 50 cm de la longitud de la barra con una calificación del 0 a 6, con base en los siguientes criterios:

- |          |  |
|----------|--|
| 0 puntos | = No hay presencia aparente de déficit.          |
| 1 punto  | = 4 dedos fuera de la barra unilateralmente.     |
| 2 puntos | = Resbalones al caminar.                         |
| 3 puntos | = Cuatro dedos fuera de la barra bilateralmente. |
| 4 puntos | = Caída de la barra o más de 3 resbalones.       |
| 5 puntos | = Arrastre de un miembro.                        |
| 6 puntos | = Imposibilidad para caminar sobre la barra.     |

Esta escala ha sido utilizada previamente en evaluaciones de daño motor. Fue validada por Brailowsky y cols. en 1985 (figura 9).

Al finalizar los 4 cuartos de la barra, se sumaron los puntajes obtenidos en cada uno, para obtener su puntaje parcial. En la figura 9 se muestra un ejemplo de la ejecución de la rata a través de la barra de entrenamiento.

Cada sujeto fue evaluado de la misma forma en tres ensayos por día. Para obtener el puntaje final se tomó el promedio del tiempo que tardaron en recorrer la barra durante los tres ensayos realizados por rata. Posteriormente, se hizo la conversión del tiempo/distancia a velocidad.

En el 14º día los sujetos fueron sometidos a la cirugía para producir una lesión fototrombótica (descrita más adelante). Y a partir del 15º día se inicia la fase de recuperación, en la que se registra peso, tiempo de recorrido y déficit, similar a la línea base, durante 10 días consecutivos.

En el día 21, después de iniciado el experimento, se inyectó una sobredosis de anestesia (pentobarbital), e inmediatamente después de que presentaban paro respiratorio fueron perfundidos intracardialmente con solución salina al 0.9% seguido de fijador (paraformaldehído al 4% en buffer fosfatos 0.1 M). Se extrajo el cerebro de cada sujeto y se colocó en un frasco con fijador durante por lo menos 24 hrs.

Posteriormente los cerebros fueron colocados en soluciones de sacarosa al 20 % (durante 3 días) y al 30% (durante 2 días), y fueron cortados en rebanadas de 40 micras de grosor mediante un criostato.

## **CIRUGIA**

Cada sujeto fue anestesiado con halotano al 2% en una mezcla de (O<sub>2</sub> 95% - CO<sub>2</sub> 5%), y posteriormente colocado en un aparato estereotáxico. Se limpió la cabeza del sujeto con benzal (antiséptico), el pelo fue retirado con ayuda de unas tijeras y se realizó una incisión a la altura de la línea media removiendo el cuero cabelludo para exponer el hueso y dejar al descubierto las suturas del cráneo.

Sobre la superficie del cráneo se marcaron las coordenadas estereotáxicas correspondientes a la corteza motora (de +2 a -4 mm anteroposterior y de +2 a -3 mm lateral con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1986) (fig. 9).

Posteriormente, se colocó una placa de metal, con una apertura central de 6X4 mm sobre el cráneo, sobre las coordenadas anteriormente marcadas. Inmediatamente después se realizó una incisión en la cola de la rata, para localizar su vena. Se le colocó una cánula, a través de la cual se inyectó 0.133 ml por cada 100 gr de peso de la rata del colorante rosa de bengala, tomado de una solución patrón de 30 mg/ml disuelta en salina 0.9%. La inyección se realizó por medio de una bomba de infusión a una velocidad de 0.90 ml/min. Al término de la infusión se suturó la cola y se le colocaron pequeños vendotes a lo largo de la incisión. Finalmente se colocó la lámpara (de 550 mn de longitud de onda) sobre el centro de la placa de metal, durante 30 min. Después de suturar el cuero cabelludo, los sujetos fueron colocados en una caja para su recuperación y después reincorporados a su caja habitación. Para evitar infecciones se puso antibiótico local sobre la incisión realizada al término de la cirugía.

### **ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO**

El procedimiento de inmunohistoquímica para Bcl-2 y GFAP, consiste en los siguientes pasos:

- (1) Se eligieron cortes (anterior, posterior y medio) diferentes para cada inmunohistoquímica.
- (2) Se incuban los cortes cerebrales con el anticuerpo primario, ya sea (Bcl-2 ó GFAP), durante 72 hrs. a 4º C.
- (3) Lavado de los cortes en buffer fosfatos de sodio (PBS) durante 10 minutos.
- (4) Incubación de anticuerpo biotilnado secundario correspondiente a cada anticuerpo primario, durante 2 hrs. a temperatura ambiente.
- (5) Se repite el paso 2.
- (6) Incubación de cortes en un complejo de Avidina-Biotina, durante 2 hrs. a temperatura ambiente.
- (7) Incubación del tejido durante 5 min en diaminobenzidina (DBA) disuelta en buffer trizma 0.1 M, y posteriormente agregar 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 50 ml de buffer trizma.
- (8) Repetir los lavados (3 veces).

Finalmente los cortes fueron montados en porta objetos, un día después se pasaron por un proceso de deshidratación a base de alcoholes y xilol, e inmediatamente después, fueron recubiertos con cubreobjetos pegados con Permunt. Posteriormente los tejidos fueron analizados en un microscopio de luz, para su cuantificación.

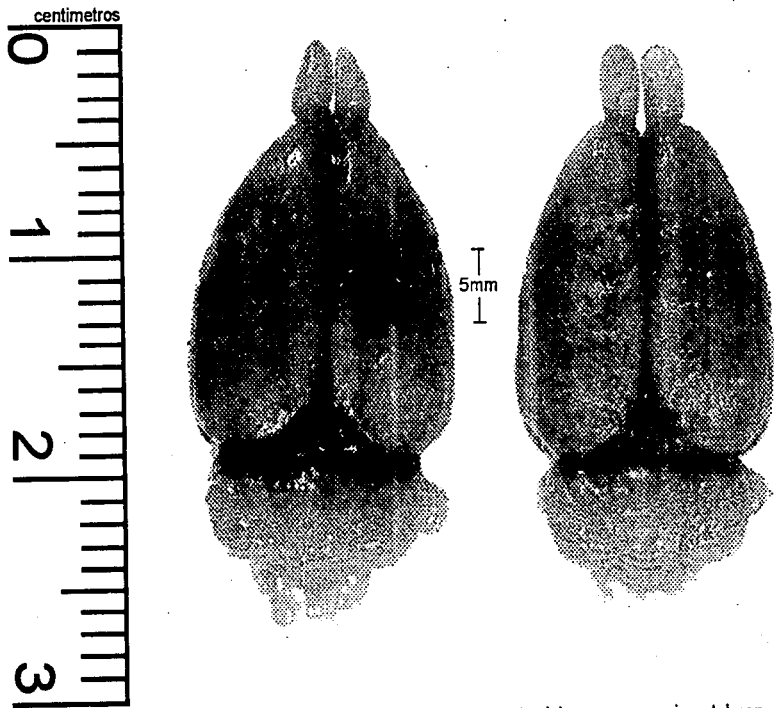


Fig. 10 Lesión cortical. Cerebro de una rata del grupo experimental con entrenamiento post-lesión (izquierda) y de una rata del grupo control (derecha)

## **MEDICIÓN DEL ÁREA LESIONADA**

Los cortes cerebrales fueron procesados por medio de técnicas histológicas (Nissl) e inmunohistoquímicas (GFAP y Bcl-2). Con los cortes obtenidos para Nissl (marcador de cuerpos celulares) se obtuvo la medición del área lesionada (fig. 14B y B'). Por medio de un analizador de imágenes (NIH Macintosh 1.6) se delimitó manualmente y se cuantificó la zona de lesión. Se tomaron en cuenta tres cortes de cada rata (anterior, medio y posterior) y a partir de ellos se calculó el promedio.

## **DETERMINACIÓN DEL ÁREA DE EXPRESIÓN DE GFAP**

Tanto en las ratas que tuvieron lesión, como en las que no tuvieron, se encontró expresión de GFAP, debido a que hay una expresión basal de dicha proteína. En la cuantificación de la zona de los cortes cerebrales de ratas que fueron dañadas, se delimitó manualmente la zona que rodea a la lesión, donde se observaba la expresión. Mientras que en las que no fueron lesionadas se tomó un área similar a las que si presentan lesión.

Una vez delimitada la zona de expresión se determinó la densidad óptica por medio de un analizador de imágenes (NIH, Macintosh 1.6)

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de ANOVA de dos vías (muestras repetidas) para las diferencias significativas entre los grupos en su conjunto y posteriormente una prueba pos hoc (Fisher) para las diferencias puntuales día tras día, es decir ésta indicó los días en los que hubo diferencias entre los grupos.

## RESULTADOS

### DEFICIT MOTOR

Se realizaron comparaciones entre los grupos control (inyección salina vía intravenosa con exposición a luz) y experimental con entrenamiento post-lesión (inyección intravenosa de rosa de bengala con exposición a luz). Los datos arrojados por la prueba de medidas repetidas muestran que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $P=.001$ ). Las diferencias puntuales se observan en la figura 10. Durante la primer fase, ambos grupos se comportaron de manera similar, pese a que existe una pequeña variación entre los días promedio por grupo, no existen diferencias estadísticamente significativas. A partir del primer día (posterior a la cirugía) la diferencia es estadísticamente significativa con una  $P= <.001$ , disminuyendo progresivamente hasta el 16° día ( $P= 0.443$ ). A partir del 15° día las diferencias entre los dos grupos ya no son significativas, es decir, durante los primeros días después de la cirugía el grupo experimental manifiesta un déficit motor contralateral a la lesión, alcanzando un puntaje máximo de 13.91, a diferencia del grupo control cuyo puntaje, en el mismo día de evaluación, asciende a 4.057.

PROMEDIO DE DEFICIT

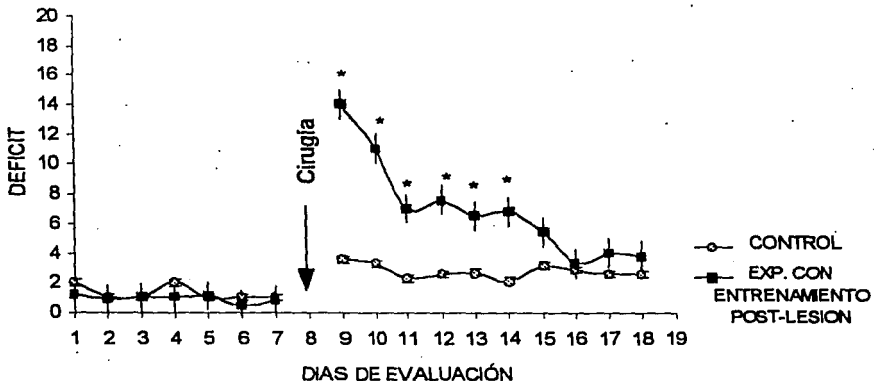


Fig. 10 Promedio del déficit motor que tuvieron las ratas antes y después de la cirugía. Grupo control ( $n=7$ ) y experimental con entrenamiento post-lesión ( $n=9$ ). Los asteriscos indican que hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p<0.001$ )  $\pm$  error estándar

## VELOCIDAD DE EJECUCIÓN

La gráfica 11 nos muestra que a medida que avanzaban los días de evaluación, los sujetos adquirían mayor velocidad, es decir, les tomaba menos tiempo atravesar la barra de un extremo a otro. Durante la primera fase la velocidad de ambos grupos se mantuvo similar, es a partir del 9º día (primer día después de la cirugía) en donde al grupo experimental le toma mayor tiempo atravesar la barra. Es en éste día en que se observan diferencias estadísticamente significativas ( $P < .001$ ), en el 13º día de evaluación la diferencia sigue siendo significativa, pero con menor  $P = .0318$ , lo cual significa que la velocidad se ha ido restableciendo con el paso del tiempo. En el 14º y 15º día las diferencias desaparecen. Con la ANOVA de medidas repetidas se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con una  $P = .01$ .

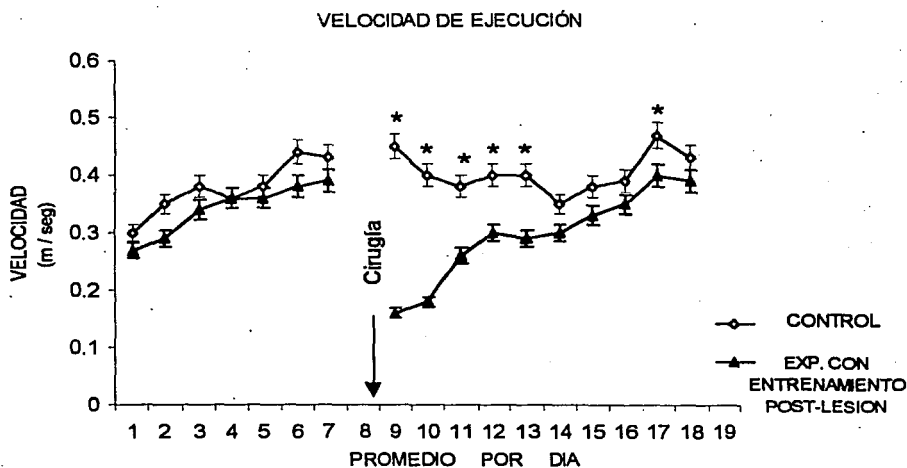


Fig. 11 Velocidad que alcanzaron ambos grupos (control y experimental con entrenamiento post-lesión) antes y después de la cirugía. Los asteriscos indican que hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.001$ )  $\pm$  error estándar.

## OBSERVACIONES HISTOLÓGICAS

### TAMAÑO DE LESIÓN

En los resultados histológicos se tomaron en cuenta los tres grupos estudiados (control, experimental con entrenamiento post-lesión y experimental sin entrenamiento post-lesión). Con la ayuda de un analizador de imágenes, la extensión de la lesión (fig. 14 B y B') se obtuvo del promedio de la medición de todos los cortes del cerebro de cada rata, teñidos con Nissl, que presentaran lesión. Pese a que el grupo sin entrenamiento, tiene la tendencia a presentar menor tamaño de lesión, en figura 12 se observa que solo existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales con y sin entrenamiento ( $P < .001$ ) con respecto al grupo control. Lo cual implica que el entrenamiento no modifica el tamaño de la lesión que presentan las ratas después de una lesión fototrombótica.

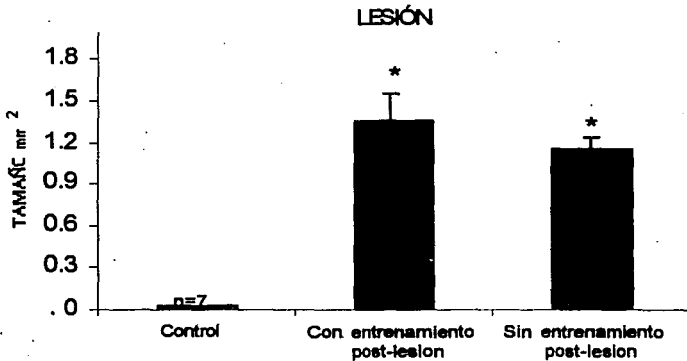


Fig. 12 Tamaño de lesión que presentó cada uno de los grupos analizados. El asterisco indica que hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.001$ )  $\pm$  error estándar.



## EXPRESION DE GFAP

Para obtener el promedio de expresión de la Proteína Fibrilar Ácida Glial, se tomaron 3 cortes (anterior, medio y posterior a la lesión) por sujeto, seleccionando cortes equivalente en los tres grupos. En la fig. 14 A y A' se muestra un ejemplo. Para este análisis se tomaron en cuenta los tres grupos (control, experimental con entrenamiento y sin entrenamiento). A diferencia de la medición del tamaño de la lesión, en el análisis de la expresión de GFAP, el grupo control no se presenta con un valor de cero, debido a que el cerebro tiene una expresión basal de la proteína.

En la figura se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo experimental sin entrenamiento ( $P=.005$ ) y con el grupo experimental con entrenamiento ( $P=.005$ ), mientras que entre los grupos experimentales sin entrenamiento y con entrenamiento no se encontraron diferencias significativas.

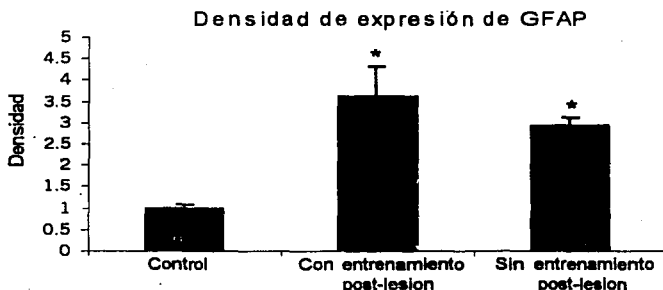
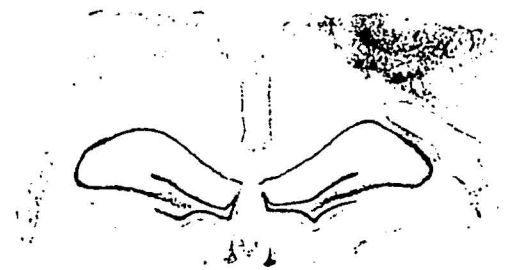


Fig. 13 Densidad de expresión de la proteína Ácido fibrilar glial en los tres grupos. El asterisco indica que hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ).

## EXPRESION DE BCL-2

Debido a que no todos los cerebros presentan expresión de la proteína Bcl-2, no se realizó un conteo del número de células marcadas. Del grupo control solo 1 de 7 ratas presentaron células marcadas; del grupo experimental sin entrenamiento 5 de 8, y del grupo experimental con entrenamiento 4 de 9. Las estructuras en las que se observaron células marcadas son: corteza cingulada, zona de penumbra, hipocampo (CA3) y giro dentado (fig. 15).

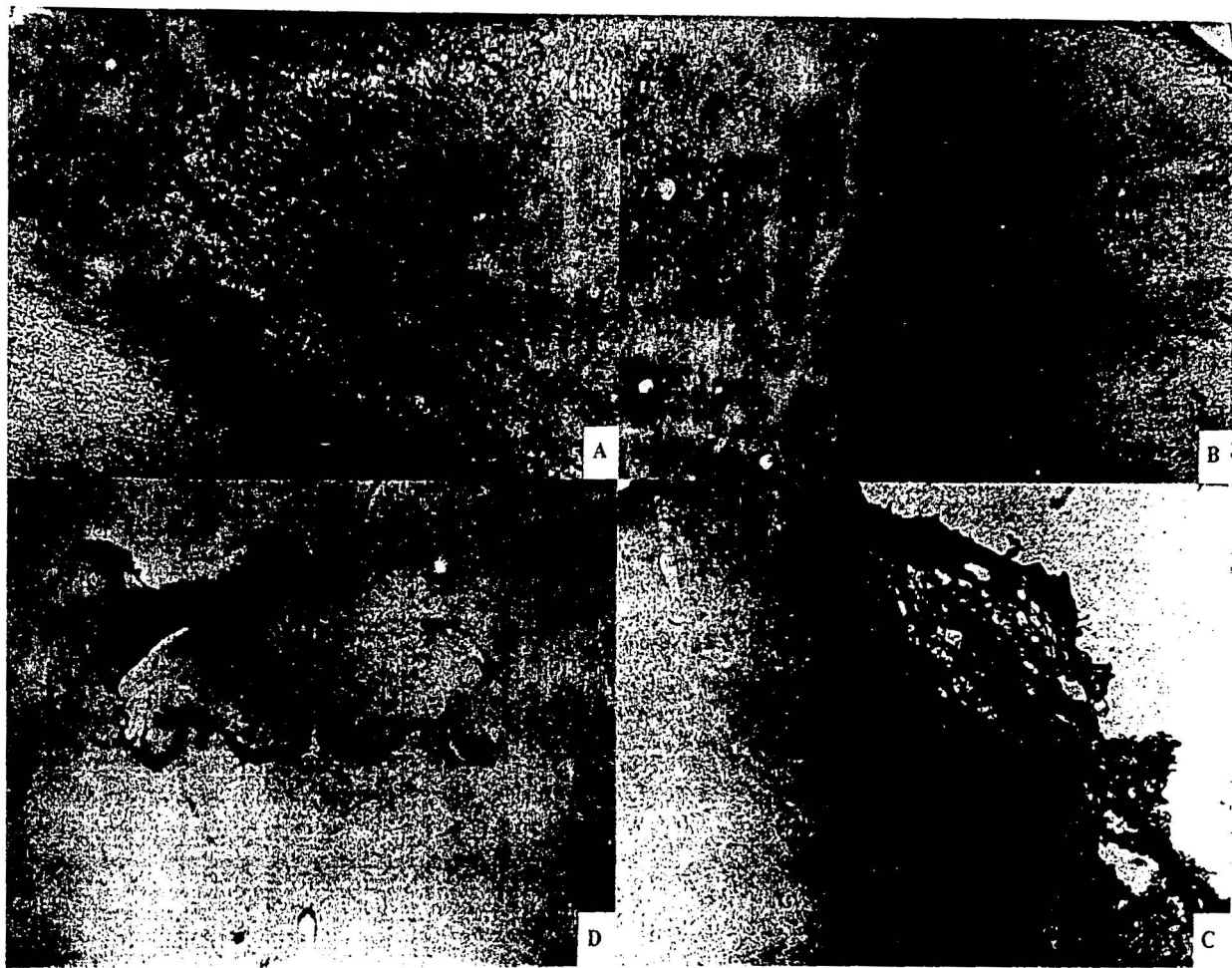


A

B

64

Fig. 14 Cortes de animales representativos que muestran el área de expresión de GFAP (A) y el área lesionada en un corte teñido con violeta de cresilo (B) de un animal sometido a ischemia después de 10 días de la cirugía. Arriba se presentan ampliaciones de los cortes mostrados en A y B respectivamente.



50 Fig. 15 Se muestran cortes de animales representativos sacrificados 10 días después de la isquemia. Se observan células inmunopositivas a Bcl-2 en CA3 de hipocampo (A), Corteza cingulada (B) y en zona de penumbra en la corteza (C). En la figura D se observa el lado contralateral e ipsilateral a la lesión.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que la utilización del modelo de isquemia fototrombótica es capaz de producir un déficit motor, similar al producido por la ablación de la corteza motora, o la infusión de GABA en la corteza motora (Brailowsky, 1985) con cambios bioquímicos similares, como son un incremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial en la zona aledaña a la lesión y un incremento discreto en la expresión de la proteína Bcl-2.

Existen diferentes modelos conductuales para evaluar el déficit motor producido en animales de laboratorio bajo condiciones controladas. Cada modelo utiliza tareas conductuales relacionadas con las estructuras nerviosas y áreas corticales específicas a estudiar. Entre dichas tareas se pueden mencionar la observación de la actividad general del animal, de la iniciación del movimiento, del movimiento de las extremidades por medio de actividades como las de alcance, presión de barras, de marcha coordinada y de conductas de voltrear, escalar, caminar y nadar (Kolb, 1996).

En investigaciones previas utilizando lesiones motoras corticales se ha estudiado la ejecución de una conducta en sesiones repetidas y se toma el tiempo de ejecución de una tarea, para realizar comparaciones y para caracterizar la recuperación o compensación conductual.

Entre las tareas utilizadas para evaluar déficits motores, se encuentran las tareas de caminata que permiten observar, además de las características de los movimientos de las extremidades, los elementos sutiles de los movimientos, como su duración y su amplitud. La caminata puede ser descrita en términos espaciales, temporales, y con relación al desplazamiento de las 4 extremidades (Kolb y Whishaw 1996).

Los resultados del presente estudio se basan en los déficits que muestran los sujetos al ser sometidos a una tarea de equilibrio y control pleno de sus extremidades al desplazarse sobre una barra elevada (figura 8). Es importante señalar, que si una rata que ha sido lesionada, se coloca sobre una superficie plana, camina igual que una rata sin lesión, sin embargo, cuando es colocada sobre una barra estrecha, el déficit es notable a primera vista.

El daño isquémico que se provoca en las ratas, desencadena una serie de manifestaciones patológicas, sobre todo en el área lesionada y aledaña

a la lesión. Entre las manifestaciones más importantes se encuentra la destrucción irremediable del tejido nervioso causando necrosis en el sitio de la isquemia focal debido a que después de la isquemia se produce un alto flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, consecuencia de la depolarización, el incremento de transmisores particularmente glutamato (que abren los canales dependientes de voltaje que activa los receptores a NMDA), y de la falla energética que evita la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP.

La pérdida de ATP combinada con anoxia, repercute en el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la mitocondria y el retículo endoplásmico. Cuando el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa se produce rompimiento de proteínas y lípidos, afectando el citoesqueleto y las funciones membranales llevado a la células a la muerte (Siesjö, 1988).

La ruptura de vasos sanguíneos causa sangrado epidural, subdural o intracerebral, en la fig. 9, se pueden observar algunos vasos trombosados y al lado un coágulo extendido que sugiere la ruptura de los vasos sanguíneos.

En un cerebro con infarto todos los elementos que lo componen incluyendo neuronas, astrocitos y vasos, se pierden. Consecuentemente, los marcadores de células gliales son evidentes en la zona infartada. En el modelo de trombosis fotoquímica el daño se produce radicales libres que dañan las células endoteliales, inducen trombosis, y la subsecuente isquemia irreversible (Watson, 1985). En las figuras 14 (A y B) y 15 (A-C) se observa una cavidad que compone la zona lesionada.

Después del establecimiento de una lesión, uno de las primeras reacciones es que las células astrogliales se transforman en astrocitos reactivos hipertróficos, que aumentan la síntesis de GFAP, haciendo posible detectar su inmunoreactividad con anticuerpos anti-GFAP (Eng, 1983). Son visibles incluso por períodos hasta de 35 días después de la lesión (Moumdjian, 1991). Estos datos apoyan los obtenidos en el presente estudio, en donde se observa que la expresión de la proteína GFAP aún se encuentra presente diez días después de la cirugía (fig. 14 A).

En general las lesiones cerebrales pueden producir retrasos en la iniciación de los movimientos y torpeza en su ejecución. Ante el daño cerebral los músculos que normalmente trabajan en conjunto pierden la capacidad de hacerlo, con lo que los movimientos se tornan incompletos o imprecisos provocando errores en la velocidad, fuerza, y ritmo de la ejecución motora.

Las disfunciones provocadas por lesiones en corteza motora dependen de su localización que se traduce en la dificultad de ejecutar movimientos o secuencias de movimientos parcial o totalmente voluntarios. Al lesionar unilateralmente la corteza motora se produce hemiplejía como la que presentan los sujetos analizados en este estudio (figura 10).

Existen evidencias de que un factor importante en la recuperación funcional es el entrenamiento conductual, dicha recuperación está mediada por cambios morfológicos a nivel neuronal. A principios de 1990, Juno y Schallert (1992, 1994) reportaron que después de realizar lesiones electroolíticas unilaterales en el área cortical motora que inerva la extremidad anterior contralateral, se observa decremento en el uso de la extremidad lesionada e incremento en el uso de la extremidad intacta aunado a un incremento en la arborización dendrítica de la corteza somatomotora intacta. El periodo de mayor arborización coincidía con el período en que los sujetos mostraban mayor asimetría conductual. Después de éste período se observó un proceso de eliminación de los procesos dendríticos que se asoció a un uso más simétrico de las extremidades. Asimismo observaron que si se bloqueaba el proceso de arborización, restringido al uso de la extremidad intacta, entonces los impedimentos sensoriomotores eran más notables.

Los resultados obtenidos, evidenciaron la presencia de un período después de la lesión cortical durante el que ocurren cambios estructurales neurales en presencia de una demanda conductual adecuada, así como los cambios fisiológicos que se dan en respuesta del entrenamiento conductual.

Por otro lado Nudo y cols. (1996 a, b) también reportan la importancia del entrenamiento conductual o rehabilitación en la recuperación funcional como un proceso mediado neuralmente. Este grupo estudió por medio de microestimulación intracortical la recuperación funcional motora en monos después de producir un infarto unilateral en la corteza motora. Previo a la lesión se realizó un mapeo cerebral del área que inerva una de las extremidades superiores, se sometió a los sujetos a un entrenamiento motor que implicaba el uso de la extremidad contralateral al área impedida, se lesionó unilateralmente la corteza motora, se sometió a los sujetos a un proceso de reentrenamiento (rehabilitación) y se realizó un segundo mapeo cerebral. Los resultados de este estudio muestran que los sujetos sufrieron una reorganización neural en las áreas adyacentes a la zona lesionada y a dicha reorganización se le adjudió la subsecuente

recuperación funcional, dado que la estimulación de estas zonas que inicialmente no evocaban movimientos de la extremidad superior lo hacían después del reentrenamiento. Más aún, observaron que la restricción en el uso de la extremidad intacta en monos lesionados que no recibieron reentrenamiento, se reflejaba en un decremento de la zona cortical adyacente al área lesionada. Estos resultados concuerdan con observaciones anteriores en las que se demostró que el no someter a sujetos lesionados a un período de reentrenamiento post-lesión resultaba en un decremento de las áreas corticales que rodean a la zona de lesión (Nudo, 1996b).

Posiblemente, estos estudios sugieren que la rehabilitación conductual, previene la pérdida de tejido intacto que rodea a la lesión y que la experiencia post-lesión juega un papel importante en la subsecuente reorganización fisiológica que ocurre de forma inevitable en el tejido adyacente intacto.

La terapia de rehabilitación promueve la reorganización neural y esta puede estar mediando la recuperación funcional que se observa después de que el sistema ha sufrido una lesión cortical.

Dado que se han encontrado diferencias neurales y neuroquímicas en sujetos que han sido sometidos a diferentes tratamientos conductuales, en el presente estudio se analizó si había alteraciones en la expresión de GFAP, Bcl-2 y en el tamaño de lesión en sujetos que fueron sometidos a entrenamiento antes y después de la lesión y en sujetos que solo fueron sometidos a entrenamiento antes de ésta.

Encontramos que a pesar de que no existen diferencias significativas, el grupo con entrenamiento post-lesión tiende a tener mayor expresión tanto de la proteína de GFAP (fig. 13) como de Bcl-2 y mayor tamaño de lesión (fig. 12). Sin embargo estos resultados deben ser tomados con reserva debido a que la evaluación de la expresión de estas dos proteínas podría no ser suficiente para determinar si el entrenamiento post-lesión puede influir en la recuperación del área lesionada.

Probablemente se requiere hacer un curso temporal de análisis para observar la progresión de los cambios y su correlación a nivel histológico y conductual. Por lo que se requiere hacer experimentos en diferentes intervalos de tiempo para determinar si efectivamente no hay diferencias. Por otro lado, las diferencias entre ambos grupos, podría ser determinada con marcadores que detecten cambios más finos en las células (por ejemplo: aparición de espinas dendríticas, marcadores sinápticos como la sinaptofisina), además de los utilizados en el presente estudio.

## CONCLUSIONES

El entendimiento de los procesos que dan lugar a disfunciones o a enfermedades neurológicas en los humanos depende, por un lado, del análisis directo de los casos que se presentan y por el otro del análisis indirecto que se pueda hacer de ellos. Una de estas opciones es cubierta por los estudios que se llevan a cabo en animales de laboratorio que, como es bien sabido, permiten la manipulación y el control de las condiciones experimentales.

La reproducción del modelo de fototrombosis, desarrollado por Watson, pretende acercarse a las condiciones reales que puede tener una persona al ser víctima de una lesión isquémica, partiendo del análisis conductual y celular.

Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente, el modelo es altamente reproducible, y que por medio de las observaciones a nivel conductual se pueden evaluar y proponer estrategias o tratamientos que ayuden a que el cerebro lesionado se recupere en el menor tiempo posible.

Por otro lado, en nuestros resultados, el manejo conductual (entrenamiento) al que son sometidas las ratas después de establecer una lesión isquémica en nuestra condiciones experimentales no fue suficiente para reducir el tamaño de lesión ni para generar mayor expresión de las proteínas GFAP y Bcl-2, aunque no se descarta la idea de que haya habido cambios en tiempos más cortos o más largos.

Este resultado se puede deber a que la manipulación conductual no haya sido suficiente, para producir cambios o a que se requieran métodos de análisis más finos, para comprobar de qué manera, el entrenamiento, provoca cambios a nivel celular.

Finalmente se puede concluir que la aportación que ofrece este estudio es importante para futuras investigaciones en las que se pretenda estudiar las alteraciones producidas, por un daño isquémico, no sólo a nivel morfológico y conductual, sino a nivel molecular o bioquímico.



## **PERSPECTIVAS**

La búsqueda de nuevos tratamientos para los pacientes con problemas neurológicos a causa de lesiones cerebro- vasculares es importante para reducir el alto porcentaje de muertes o de incapacitación que ocurren a causa de este tipo de lesiones.

La utilización del modelo de fototrombosis en la búsqueda de dichos tratamientos, resulta ventajosa frente a otros modelos invasivos que se han utilizado para dicho fin. Algunas de las ventajas que ofrece es que no implica una cirugía invasiva, es un modelo de trombo, no de oclusión mecánica, la lesión es altamente reproducible, y puede ser bien delimitada, permitiendo estudiar el déficit y la recuperación de funciones relacionadas con la estructura en cuestión.

La administración de tratamientos farmacológicos, ayudarán a des-  
pejar y ampliar la información que hasta el momento se tiene sobre los  
problemas cerebrovasculares.

## BIBLIOGRAFIA

- Amlil, R. C. y Finger, S. (1988). *Toward a definition of recovery of function. En Finger S., Levere, T. E., Amlil, C. R., y SDonald, G. S. (eds.), Brain Injury and Recovery: Theoretical and Controversial Issues*, pp. 1-13. New York: Plenum Press.
- Asahi, M.; Hoshimaru, M.; Uemaura, Y.; Tokime, T.; Kojima, M.; Ohtsuka, T.; Matsura, N.; Aoki, T.; Shibahara, K. y Kikuchi, H. (1997) *Expression of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme gene family and bcl-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. J. Cereb. Blood Flow Metab. Jan; 17(1):11-8*
- Bach-y-Rita, Paul (ed.) (1980) *Recovery of function: Theoretical considerations for brain injury rehabilitation*. Hans Huber Publishers Bern Stuttgart Vienna
- Brailowsky, K. S. y Knigh, R.T. (1985). *Recovery from GABA- mediated hemiplegia in young and aged rats: effects of catecholaminergic manipulations. Neurobiology of aging, Vol. 8: 441-447.*
- Brailowsky, K.S.; Knigh, R.T.; Blood, K. y Scabini, D. (1986).  *$\gamma$ -aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. Brain research, 362: 322-330.*
- Brailowsky, K. S.; Montiel, T.; Hernández, E.; Flores -Hernández, J. y Hernández-Pineda, R. (1991) *Acceleration of functional recovery from motor cortex ablation by two Ginkgo biloba extracts in rats. Resto. Neurol.Neurosci. 3:267-274.*
- Cesaro, P. (1996) *Advances in Ginkgo Biloba. Advances in Ginkgo Biloba Extract Research, 121-126*
- Clark, R. S.; Chen, J.; Watkins, S. C.; Kochanek, P. M.; Chen, M.; Stetler, R. A.; Loeffert, J. E. Y Graham, S. H. (1997) *Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. The Journal of Neuroscience 17(23):9172-9182*
- Cohen, J. J.; Ducke, R. C.; Fadock, V. A. y Sellins, K. (1993) *Apoptosis and Programed Cell Death in Immunity. Annual Review of immunology, vol. 10:267-293*
- Chao, C. C.; Hu, S. y Peterson, P. K. (1995) *Glia, Cytokines, and Neurotoxicit. Critical Reviews in Neurobiology, 9 (2-3):189-205*
- Chen, J. G.; Graham, S. H.; Chan, P. H.; Lan, J.; Zhou, R. L. y Simon, R.P. (1995) *Bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. Neuroreport 6:394-398*
- Choi, D. W. (1990) *Ischemia-induced neuronal apoptosis. Current Opinion in Neuro biology 6:667-672*
- Critchley, M. (1930) *the anterior cerebral artery and its syndromes. Brain 33:120-165*
- De Rick, M. (1997) *Ionic channels, cholinergic mechanism, and recovery of sensorimotor function after neocortical infarcts in rats. Stroke 190:21 (suppl 3): 158-163*
- Duke, R. C.; Ojcius, D. M. y Young, J. D. (1997) *Suicidio celular en la salud y en la enfermedad. Investigación y ciencia, febrero:44-52*
- Eng L. W. y De Armond S. J. (1983) *Immunochemistry of the glial fibrillary acidic protein. Progress in Neuropathology (ed Zimmerman H. M.). Vol. 5 pp. 19-39. Raven Press. New York*
- Ferrer, I.; Tortosa, A.; Condom, E.; Blanco, R.; Macaya, A. y Planas, A. (1994) *Increased expression of bcl-2 immunoreactivity in the developin cerebral cortex of the rat. Neuroscience Letters 179: 13-16*
- Ferrer, I.; López, E.; Blanco, R.; Rivera, R.; Ballabriga, J.; Pozas, E. y Martí, E. (1998) *Bcl-2, Bax and Bcl-x expression in the CA1 area of the hippocampus following transient forebrain ischemia in the adult gerbil. Exp Brain Res 121:167-173*
- Franz, S. I.; Scheetz, M. E. y Wilson, A. A. (1915) *The possibility of recovery of motor function in long-standing hemiplegia. Jour. A. M. Dec. 18:125-132*
- Gillardon, F.; Wickert, H. y Zimmermann, M. (1994) *Differential expression of bcl-2 and bax in axotomized dorsal root ganglia of young and adult rats. European Journal of Neuroscience 6:1641-1644*

TEXIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- González-García M.; Dng, G. I. y Boise, O. S. (1995). *bcl-x* is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4304-8
- Graham, S. H.; Chen, J.; Stetler, R. A.; Zhu, R. L.; Lin, K. J. y Simon R. P. (1996) *Expression of the proto-oncogene bcl-2 is increased in the rat brain following kainate-induced seizures.* Restorative Neurology and Neuroscience (9)243-250
- Hara, A.; Iwai, T.; Niwa, M.; Uematsu, T.; Yoshimi, N.; Tanaka, T. y Mori, H. (1996) *Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia.* Brain research 711: 249-253
- Hockenberry, D. M.; Oltvai, Z. N.; Yin, X.; Milliman, C. L. y Korsmeyer, S. J. (1993) *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.* Cell 75:241-251
- Honkaniemi, J.; Massa, S. M. y Sharp, F. R. (1996) *Apoptosis associated genes are induced in gerbil hippocampus following global ischemia.* Restorative Neurology and Neuroscience (9) 227-230
- Hunter, A. J.; Mackay, K. B. y Rogers, D. C. (1998) *To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents.* TIPPS 19:59-66
- Isenmann, S.; Stoll, G.; Shroeter, M.; Krajewski, S.; Reed, J. C. y Bahr, M. (1998) *Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-x proteins in focal cortical ischemia in the rat.* Brain Pathol jan;8(1):49-63
- Jacobs, K.; Moulin, T.; Bogousslavsky, J.; Woimant, F.; Dehaene, I.; Tatu, L.; Besson, G.; Assouline, E. y Casselman, J. (1996) *The stroke syndrome of cortical vein thrombosis.* Neurology 47:377-382
- Jaw, S. P.; Su, D. D. y Truong, D. D. (1995) *Expression of Bcl-2 and Bax in the frontoparietal cortex of the rat following cardiac arrest.* Brain Research Bulletin. 38 (6):577-580
- Kane, D. J.; Ord, T.; Anton, R.; Hahn, H. y Gralla, E. B. (1993) *Bcl-2 inhibition or neural cell death: decreased generation of reactive oxygen species.* Science 262:1274-77
- Kane, D. J.; Ord, T. y Bredesen, D. E. (1995) *Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death.* J. Neurosci. Res. 40:269-75
- Karpiak, S. E.; Tagliavia, A. y Wakade, C. G. (1989) *Animal models for the study of drugs in ischemic stroke.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 403-14
- Kolb, B. y Whishaw, I. Q. (1996). *Fundamentals of human Neuropsychology.* En Atkinson, R. C., Lindzey, G., y Thompson, R. F. (eds.) 4ª edición, New York, W. H. Freeman and Company
- Kunimoto, M. (1994) *Methyl mercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 310-317
- Lashley, K. S. (1929). *Brain mechanisms and intelligence.* Chicago: University of Chicago
- Lennon, S. V.; Martin S. J. y Cotter T. G. (1991) *Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli.* Cell Prolif. 24, 203-214
- Linnik, M. D.; Zobrist, R. H. y Hatfield, M. D. (1993) *Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats.* Stroke 24:2002-9
- Ljunggren, B. H.; Schutz, B. K. y Siesjo, B. K. (1974) *Ischemia cerebral.* Brain Res., 73:277-289
- Maron S. H. y Pruton, C. F. (1990) *Fotofísica cap. 19. En fundamento de fisicoquímica.* 18 imosición. Ed Limusa; México.
- Martin, L. J.; Al-Adbulla, N. A.; Brambrink, A. M.; Kirsch, J. R.; Sieber, F. E. y Portera-Cailliau, C. (1998) *Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis.* Brain Research Bulletin 46(4):281-309
- Martinou, J.-C.; Dubois-Dauphin, M.; Staple, J.K.; Rodríguez, I. y Frankowski, H. (1994) *Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia.* Neuron 13: 1017-1030

- Matsushita, K.; Matsuyama, T.; Kitagawa, K.; Matsumoto; M., Yanagihara, T. y Sugita, M. (1998) *Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice*. *Neuroscience* Mayo; 83(2):439-48
- Merry, D. E.; Veis, D. J. y Korsmeyer, S. J. (1994) *bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retrained in the adult*. *Development* 120:301-11
- Merry, D. E. y Korsmeyer, S. J. (1997) *Bcl-2 gene family in the nervous system*. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:245-67
- Merzenich, M. M.; Nelson, R. J.; Stryker, M. P.; Cynader, M. S.; Schoppmann, A. y Zook, J. M. (1984) *Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys*. *J. Comp. Neurol.* 224: 591-605
- Metz, C. R. (1991) *Fotoquímica, cap. 11. Fisicoquímica. Segunda edición. Ed. Limusa México*
- Molinari, G. F. y Lauren, J. P. (1976) *A classification of experimental models of brain ischemia*. *Stroke* 7:14-17
- Moreno, F.; Lombardi, G. y Penagrin-Haussoone, S. 1993. *Photocoagulation-induced lesion of the rat retina: a quantitative model for the evaluation of ischemia-induced retinal damage*. *J. Research* 33: 1887-1891
- Moumdjian, R. A.; Antel, J. P. y Young, W. V. (1991) *Origin of contralateral reactive gliosis in surgically injured rat cerebral cortex*. *Brain Research*, 547, 223-228.
- Nordstrom, C. H. (1978) *Changes in the ischemia cerebral* *Stroke*, 9:327-335
- Nudo, R. J.; Milliken, G. W.; Jenkins, W. M. y Merzenich, M. M. (1996a). *Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex on adult squirrel monkeys*. *Journal of Neurophysiology*, 75 (5), 2144-2149.
- Nudo, R. J.; Wise, B. M.; SiFuentes, F. y Milliken, G. W. (1996b) *Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct*. *Science*, 272, 1971-1794.
- Oppenheim, R. W. (1991) *Cell death during development of the nervous system*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501
- Paxinos, G., y Watson, C. (1986), *The rat brain in the stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Perry, J. (1983) *Rehabilitation of the neurologically disabled patient: principles, practice, and scientific basis*. *J Neurosurg* 58: 799-816.
- Pulsinelli, W. A. y Brierley J. B. (1979) *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat*. *Stroke* 10:257-72
- Pulsinelli, W. A.; Brierley J. B. y Plum F. (1982) *Temporal Profile of neuronal damage in model of transient forebrain ischemia*. *Ann Neurol* 11:491
- Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D. y Katz, L. C.; LaMantia, A. y McNamara, J. O. (ed.). (1997) *Neurosciences*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts
- Reed, C. J. (1994) *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. *The journal of cell Biology* 124 (1-2):1-6
- Scremin, O. V. (1995) *Cerebral vascular system. En the rat nervous system. 2th edition, Paxinos, G. (ed.) E. U.A.-Australia: Academic Press, inc. 1995*
- Schiene, K.; Bruehl, C.; Zilles, K.; Quo, M.; Hagemann, G.; Kraemer, M. y Witte, O. W. (1996) *Neuronal hyperexcitability and reduction of GABA A-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* Sep; 16 (5):906-14
- Schimmsaky, K.; Ishida, A. y Kawai N., (1994) *Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus*. *Neurosci. Res.*, 20 95-99
- Sheldon, B. W.; Crawford, P. y Brewer, N.R. (1979) *Morphophysiology en Baker, H. J., Lindsey, J. R., y Weisbroth, S. H. (eds) The laboratory rat: Biology and diseases*. Vol. 1 American College of laboratory Animal medicine series. Academic Press, inc.
- Siesjö, B. K. (1988) *Mechanism of ischemic brain damage*. *Critical Care Medicine* 16(10): 954-963

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

- Smith, M. L.; Auer, R. N. y Siesjö, B. K. (1984) *The density and distribution of ischemic brain injury in the rat followin two to ten minutes of forebrain ischemia*. Acta Neuropathol. 64:319
- Stoll, G.; Jander, S. y Schoeter, M. K. (1998) *Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions* Progress in Neurobiology Vol. 56 149-171
- Tamura, A.; Graham, D. I.; McCulloch, J. y Teasdale, G. M. (1981) *Focal cerebral ischemia in the rat: 1- Description of technique and early neuropathological consequences followin middle cerebral artery oclusion*. J. Cereb. Blood Flow Metab 1:53-60
- Tatarinov, v. G. (1996) *Anatomía y fisiología humana*. México: Instituto Politécnico Nacional
- Toole, J. F. (1990) *Cerebrovascular Disorders*. 4th ed. U.S.A. Raven Press.
- Tsujimoto, Y. y Croce, C. M. (1986) *Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lynfoma*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:5214-5218.
- Watson, B. D.; Dietrich, W. D.; Busto, R.; Wachtel, M. S. y Ginsberg, M. D. (1985) *Induction of reproducible Brain infarction by photochemically initiated thrombosis*. Ann Neurol 17:497-504
- Welch, K. M. A. y Barkley, G. L. (1986) *Biochemistry and Pharmacology of cerebral ischemia*. En Stroke, ed. H. J. M. Barnett, J. P. Mohr, B. M. Stein, F. M. Yatsu, vol.1, pp. 75-90. Churchill Livinstone, N. Y.