

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

188

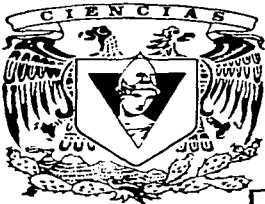
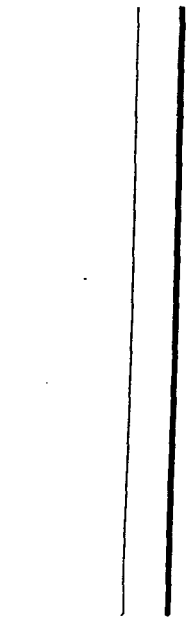
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL DAÑO CELULAR PRODUCIDO POR ISQUEMIA CEREBRAL EN UN MODELO DE RATA.

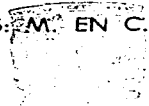
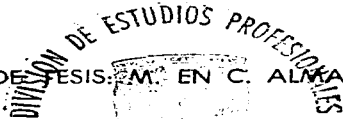
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA CARLOS SANDOVAL JAIME



DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. ALMA ORTIZ PLATA



2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION DE CLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



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.

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



REPUBLICA NACIONAL  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Carlos Sandoval Jaime

FECHA: 18/07/03

FIRMA: [Firma manuscrita]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Estudio del daño celular producido por isquemia cerebral en un modelo de rata.

realizado por Carlos Sandoval Jaime

con número de cuenta 9314120-4, quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

M. en C. Alma Ortíz Plata

Propietario

Med. Cir. Jesús Daniel Rembao Bojórquez

Propietario

Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca

Suplente

Dra. Clara Esquivel Huesca

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

B

Esta tesis se elaboró en el Departamento de Neuropatología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez de la Secretaría de Salud.

El investigador puede superar todos los peligros que sus debilidades personales le planteen.

Puede conservar el entusiasmo de la juventud, que le empujó a contemplar los misterios del Universo.

Puede seguir dando gracias por el extraordinario privilegio de participar en su exploración.

Puede sentir un gozo constante por los descubrimientos hechos por otros, tanto en el pasado como en su propia época.

Y puede aprender la difícil lección de que el viaje mismo, y no solo la gran conquista, da plenitud a la vida humana.

Stern (1965)

## Índice

Resumen . . . . .	1
Introducción . . . . .	2
Enfermedad Vascular . . . . .	2
Apoptosis Crónica de una muerte celular programada . . . . .	6
Diferencias entre apoptosis y necrosis . . . . .	7
Encendido y apagado del programa de muerte . . . . .	11
Caspasas ejecutoras de la muerte celular por apoptosis . . . . .	12
Estrés oxidativo . . . . .	14
Antecedentes . . . . .	16
Justificación . . . . .	18
Objetivos . . . . .	19
Material y Método . . . . .	20
Procesamiento de material biológico . . . . .	22
Resultados . . . . .	26
Discusión y Conclusiones . . . . .	30
Anexo . . . . .	33
Bibliografía . . . . .	40

## **Resumen**

**Estudio del daño celular producido por isquemia cerebral en un modelo de rata.**

### **Antecedentes.**

La enfermedad vascular cerebral isquémica constituye una de las primeras causas de morbilidad en el mundo. Por tal motivo, la investigación en este campo se ha enfocado a tratar de identificar los mecanismos de daño celular isquémico. Algunos estudios han demostrado que en la lesión neuronal isquémica participa también la muerte celular por apoptosis, un proceso activo regulado en forma predeterminada, con características morfológicas y bioquímicas particulares, y potencialmente regulable.

### **Objetivo General**

Estudiar el daño celular que produce la isquemia cerebral focal en un modelo de rata.

### **Hipótesis**

El daño celular es proporcional al tiempo de isquemia, por lo que es posible localizar el inicio del daño ocasionado por la isquemia cerebral focal sin reperforación, en un rango de tiempo de 5 a 15 minutos.

### **Material y Métodos.**

Se utilizaron ratas Wistar en las que se produjo un modelo experimental de isquemia cerebral focal. La prueba se realizó con distintos tiempos de isquemia. Se obtuvieron muestras histológicas de las regiones frontal, parietal, occipital e hipocampo y se practicaron diferentes técnicas: microscopía óptica con hematoxilina-eosina, microscopio electrónica, LM-PCR, y TUNEL.

### **Resultados.**

La tinción con hematoxilina-eosina mostró cambios histológicos compatibles con necrosis a partir de los 5 min de isquemia. A los 12 min de isquemia comienzan a aparecer, con predominio en hipocampo y occipital, cambios sugestivos de apoptosis. La microscopía electrónica demostró también en algunas células condensación de la cromatina y confirmó los cambios considerados por microscopía óptica a los 12 min. Lo que se corroboró con el LM-PCR que mostró la fragmentación característica del ADN. La prueba de TUNEL fue también positiva en hipocampo y occipital.

### **Conclusiones.**

De las técnicas realizadas, los resultados encontrados sugieren fuertemente la presencia de apoptosis en células cerebrales a partir de los 12 min de isquemia focal, lo que evidenciaría la participación de procesos celulares activos, y por lo tanto potencialmente regulables, en fases tempranas de la muerte neuronal isquémica.



## **INTRODUCCIÓN**

### **La Enfermedad Vascular**

El encéfalo, más que cualquier otro órgano, depende de un riego sanguíneo constante. La circulación sanguínea cerebral esta garantizada mediante una serie de barorreceptores y reflejos vasomotores que se encuentran bajo el control de los centros de la parte baja del tallo cerebral (Hakim y cols. 1987). El término Enfermedad Vasculat Cerebral (EVC), designa a cualquier anomalía del cerebro que se presenta como resultado de un proceso patológico de los vasos sanguíneos. Que incluye la oclusión de la luz por trombos o émbolos, rotura del vaso y lesión o trastornos de la permeabilidad de la pared vascular con aumento de la viscosidad u otros cambios en la calidad de la sangre. Se atribuye la misma importancia a los cambios parenquimatosos secundarios que ocurren en el encéfalo (Heiss y cols 1983). Estos son de dos tipos, isquemia, con infarto o sin él y hemorragia. En experimentos con animales la detención completa del flujo sanguíneo durante más de cuatro a cinco minutos produce lesión irreversible. El tejido encefálico privado de sangre experimenta necrosis isquémica. La disminución o falla en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) se divide en dos clases: la isquemia cerebral focal y la isquemia cerebral global. Esta última, se presenta en situaciones de paro cardíaco o falla hemodinámica. Si es absoluta, no se produce flujo colateral y sobreviene destrucción irreversible de las neuronas en plazo de cuatro a ocho minutos a la temperatura corporal. En la isquemia focal, hay una falla en el suministro sanguíneo en una parte del cerebro, por la oclusión en una arteria en particular, y casi siempre se presenta un grado variable de descarga de sangre oxigenada (Adams 1998).

En el Sistema Nervioso Central (SNC) la viabilidad del tejido sometido a isquemia esta en relación inversa con la gravedad y la duración de la misma, así que, cuanto mayor sea la reducción del FSC más grave será el daño. Por otra parte, el trastorno producido por la isquemia tiene lugar de forma progresiva en función del tiempo que esta se mantenga, desembocando igualmente en la muerte celular si

se perpetúa la situación de hipoperfusión. En aquellos territorios en que existe circulación colateral, ésta permite el mantenimiento de un flujo residual que, en muchos casos, es suficiente para preservar la vida de la célula aunque no su función. Esto también es posible cuando el FSC no queda por completo interrumpido, pero, si esta situación se prolonga por encima de un umbral de tiempo terminará, produciéndose la muerte celular, aunque la intensidad de flujo se mantenga constante.

De esta forma el daño neuronal se produce en 2 fases:

1 Una fase aguda, en la que se presenta falta de moléculas de alta energía, produciendo un infarto agudo en el centro de la zona isquémica, donde las neuronas mueren inmediatamente por necrosis.

2 Una fase tardía, en la región periférica a la zona de infarto ( zona perinfarto) (Hakim y cols, 1987, Nedergaard y cols, 1996), conocida como zona de penumbra isquémica, donde ocurren cambios progresivos post-isquémicos que llevan a la muerte neuronal selectiva, en las áreas vulnerables, aún después del restablecimiento de la circulación. En esta zona la muerte celular es retardada, ya sea por apoptosis o necrosis (Sweeney y cols. 1995).

El área de penumbra se caracteriza por un FSC reducido que afecta al metabolismo energético y a determinadas funciones celulares, pero que, al menos temporalmente, es suficiente para mantener la viabilidad celular. En esta situación, la pérdida de funciones dependientes de energía como las bombas iónicas tiene lugar de manera gradual. Se han podido determinar los umbrales de flujo a partir de los cuales se van perdiendo diversas propiedades celulares. Inicialmente, se inhibe la síntesis de proteínas (FSC < 0.55 ml/g/m). Posteriormente, se pone en marcha el metabolismo anaerobio de la glucosa (< 0.35 ml/g/m). La caída en la producción de energía traducida en la pérdida de actividad eléctrica neuronal, se produce por debajo de 0.25 ml/g/m. Al igual que la acidosis tisular, consecuencia

del acúmulo de lactato, la pérdida de los gradientes iónicos transmembranales, que conducen a la despolarización y liberación de aminoácidos excitatorios como Glutamato y Aspartato. Finalmente, la muerte celular tiene lugar cuando el FSC cae por debajo de 0.15ml/g/m (Fig.1) (Astrup y cols 1981, Heiss y cols 1983).

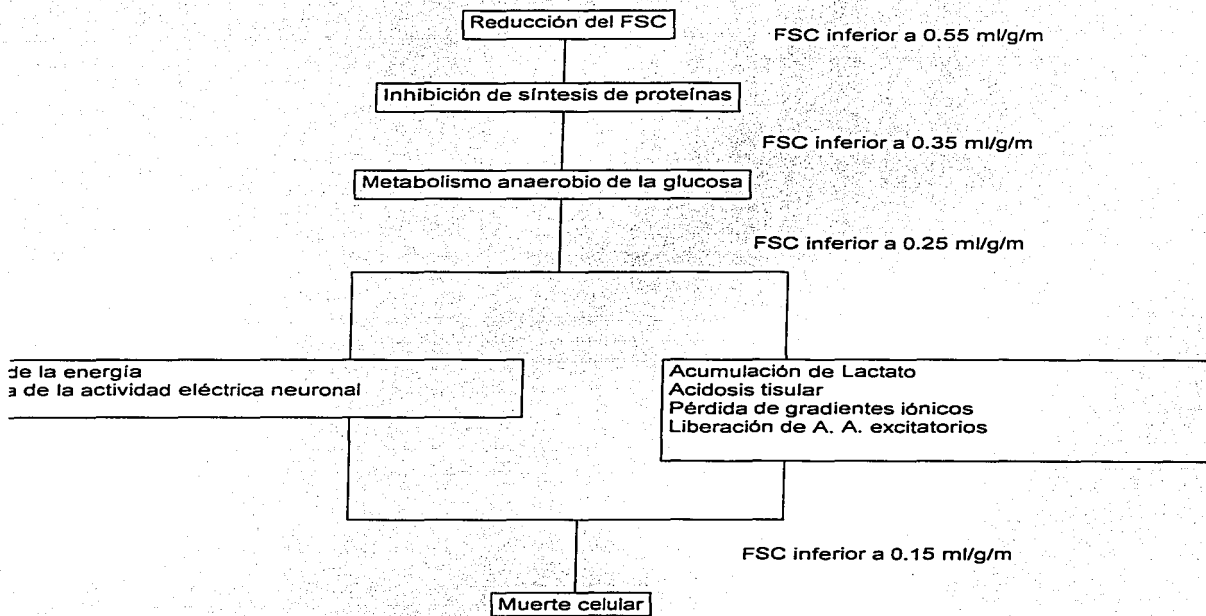


Fig.1 Cadena de reacciones que conducen a la muerte celular

Todo esto produce una falla de la homeostasis, con un aumento del ácido láctico, aumento de radicales libres y lesión glial. Por otro lado, a nivel neuronal se produce alteración de las membranas con despolarización, aumento del Na<sup>+</sup> intracelular y aumento del K<sup>+</sup> extracelular. También se va a producir un aumento del flujo de Ca<sup>++</sup> hacia el interior de la célula a través de canales dependientes de

voltaje. El  $\text{Ca}^{++}$  provoca daño de la membrana neuronal por peroxidación de los lípidos. Produce aumento en las lipasas, en la óxido nítrico sintetasa y de las proteasas que llevan a la proteólisis, al aumento de radicales libres y a la lipólisis. A su vez la falla de la homeostasis, alteración y despolarización de las membranas provoca un aumento de la liberación de neurotransmisores como la noradrenalina y la dopamina, ocasionando un circuito de retroalimentación positiva, y llevando a la auto oxidación celular (Castillo, 2000).

Existe pues, un deterioro progresivo en el área de penumbra derivado de las alteraciones producidas por el desequilibrio energético, que se traduce en la extensión del área de infarto.

Puesto que el desencadenante primario del daño por isquemia es la reducción del FSC, cabe suponer que la restitución del mismo, permitiría la recuperación de las células que aún sean viables. Pero, no ocurre así. Se ha podido comprobar que, salvo que ocurra muy precozmente. La normalización del aporte sanguíneo no evita la progresión de la lesión celular y además añade efectos deletéreos que se suman a la cascada de trastornos desencadenados por la isquemia, originando el denominado daño de reperfusión, que tienen como consecuencia la extensión del área de infarto. Por otra parte, en modelos de isquemia global se ha podido observar progresión de la lesión en células del hipocampo varios días después de la normalización del FSC. (García, 1992)

La isquemia afecta a todas las estirpes celulares originando la pérdida de sus funciones. Las células microgliales que derivan de premonocitos de la médula ósea que, luego de su diferenciación migran al SNC y constituyen el sistema fagocítico mononuclear (Abbas y cols 2002) pueden inducir extensión de la lesión a través de acidosis, sobrecarga de calcio citosólico y la hiperproducción de radicales libres. En la pared arterial esto se materializa en ruptura de la barrera hematoencefálica y en la abolición de la reactividad vascular normal y por tanto, de la capacidad de regulación de la circulación cerebral. Éste fenómeno tiene gran

importancia, pues contribuye a perpetuar los trastornos fisiopatológicos en la isquemia (Siesjö, 1988).

Estos fenómenos desencadenados de forma inmediata por la isquemia, ponen en marcha una cascada de reacciones que se autopropagan y, eventualmente, se potencian con la reperfusión. Dando lugar al daño de isquemia/reperfusión, término más adecuado, ya que en la mayoría de los casos, ambas van unidas y sus mediadores son comunes (Diez-Tejedor, 1993).

El desarrollo de una reacción inflamatoria y la alteración secundaria en la microcirculación, que se imbrican con, acidosis, sobrecarga de calcio citosólico y la hiperproducción de radicales libres son los pilares sobre los que descansan los mecanismos fundamentales del daño celular y molecular en la isquemia cerebral y en la reperfusión, y los responsables de la extensión del infarto a expensas del área de penumbra (Alonso, 1995).

Como ya se dijo, la muerte celular que se produce como consecuencia de la isquemia cerebral focal puede suceder de dos maneras diferentes: por necrosis y por apoptosis. La necrosis es la muerte celular pasiva que sigue a una agresión celular con daño severo de las membranas. La apoptosis es un proceso activo en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos, en el que la célula participa en su destrucción siguiendo pasos prefijados.

## **Apoptosis**

### **Crónica de una muerte celular programada**

En 1972 Kerr, Wyllie y Curie, estudiando sistemas experimentales en roedores, señalaron que las características morfológicas de la muerte celular que ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario, la regeneración hepática y el balance entre proliferación y muerte en modelos de tumores *In vivo*, son diferentes a las que presenta la muerte que ocurre como resultado de patologías o intoxicación. Por sugerencia del profesor Cormack J. del departamento Griego

de la Universidad de Aberdeen, partieron de la palabra griega  $\alpha\pi\omicron\tau\omicron\tau\omicron\sigma\iota\varsigma$  que describe el fenómeno de la caída de las hojas en otoño o el de los pétalos de las flores que caen. Así acuñaron el término Apoptosis para describir este tipo de muerte celular (Kerr y cols 1972).

Si bien la muerte celular durante el desarrollo embrionario ya había sido descrita anteriormente, la contribución de Kerr consistió en proponer que en este proceso las células destinadas a morir, participan activamente en su muerte, y que es determinada en el mantenimiento de la constitución celular de los tejidos. (Duke y col, 1996)

Otros estudios sobre la muerte neuronal durante la formación de sinapsis funcionales y sobre la muerte de células precursoras B y T autorreactivas durante la selección negativa pusieron de manifiesto la importancia de la muerte celular como mecanismo fisiológico de selección (Golstein y cols, 1992).

La evidencia acumulada hasta ahora, sugiere que la gran mayoría de las células animales son capaces de seguir esta vía de muerte. Aún células en las que normalmente no se activa el programa de muerte. Este hallazgo implica que este programa genético de autodestrucción forma parte del repertorio de respuestas celulares a señales externas o a cambios en las condiciones celulares internas (Vaux, 1993).

### **Diferencias entre apoptosis y necrosis**

Los procesos bioquímicos y macromoleculares que ocurren durante la muerte apoptótica son diferentes de los que conllevan a la necrosis (Fig.2) (Kerr, Harmon, 1991). Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células apoptóticas consiste en la condensación del citoplasma y de la reducción del volumen celular, acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana

nuclear, formando invaginaciones y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera análoga, la membrana celular sufre invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula, formando racimos de vesículas de tamaño variable que contiene organelos intactos que no se fusionan con lisosomas. Las vesículas son conocidas como cuerpos apoptóticos, que *In vitro* terminan disgregándose. *In vivo* son fagocitados por macrófagos y células vecinas. En proceso se ven involucrados antígenos de superficie y fosfatidilcerina, que sólo en estas circunstancias se hallan presentes en la lámina externa de la membrana celular de los cuerpos apoptóticos.

Característica	Necrosis	Apoptosis
Situaciones	Patológicas	Fisiológicas y patológicas
Participación celular	Pasiva carente de control genético	Activa controlada por un programa genético
Volumen celular	Aumenta	Se reduce
Cromatina nuclear	Condensación laxa y difusa	Condensación y adosamiento a la membrana nuclear
Núcleo	Fragmentado	Conservado
ADN	Degradación irregular	Fragmentación internucleosomal con patrón en escalera
ARN ribosomal	Degradación irregular	Degradación homogénea
Organelos	Se hinchan y se fusionan con lisosomas	Permanecen íntegros y no se fusionan con lisosomas
Membrana celular	Pierde la permeabilidad selectiva	Aparición de fosfatidilserina y se conserva la permeabilidad
Citoesqueleto	Se desorganiza	Conserva estructura
Citoplasma	Se vierte al espacio intersticial	Formación de cuerpos apoptóticos
Activación de proteasas	Inespecífica y asociada a disfunción lisosomal	Específica de la familia de las caspasas
Estrés oxidativo	Presente sólo en etapas tardías	Presente desde etapas tempranas
Catabolismo lipídico	Activación inespecífica de fosfolipasas	Producción de ácido araquidónico, ceramida y metabolitos derivados.
Reacción inflamatoria	Presente	Ausente
Cicatrización	Presente, a menudo con fibrosis	Ausente

Fig. 2 Diferencias entre necrosis y apoptosis

Como podemos ver una de las características más importantes de la muerte apoptótica, es que la célula no libera su contenido al espacio extracelular. Es de importancia el hacer notar que esta restringida a células de manera individual y nunca resulta en la muerte de células vecinas en las que no se hayan encendido los genes de muerte (Raff, 1992).

La compartimentalización del contenido celular evita que los antígenos celulares puedan provocar una reacción autoinmune. Característica que es la responsable de que no se produzca una respuesta inflamatoria durante la reabsorción tisular aún cuando implique la desaparición de tejidos u órganos como durante las metamorfosis en Artrópodos o la reabsorción de los oviductos en embriones machos o del mesonefros en hembras de vertebrados (Pacher, 1998).

Por otro lado, la muerte celular por necrosis sí afecta a las células adyacentes. Al igual que durante la muerte apoptótica, también se lesiona la cromatina nuclear, razón por la cual se observa un oscurecimiento en núcleo a lo cual se le llama picnosis. También se presenta en apoptosis pero es menos denso y homogéneo.

A diferencia de la apoptosis, durante la necrosis los organelos se hinchan y el volumen celular aumenta considerablemente. Los cambios se han asociado con alteraciones en el control osmótico resultado de la depleción de ATP y la consecuente disfunción de los transportadores iónicos de membrana, como la ATPasa de Na/K. Todo esto conduce a una pérdida del potencial de membrana y a un incremento en la permeabilidad membranar. Por último, los organelos se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular, permitiendo que el contenido citoplasmático se vacíe al exterior, lo que provoca la aparición de edema citotóxico. La muerte por necrosis generalmente va precedida de una respuesta inflamatoria seguida de un proceso de cicatrización que en ocasiones conlleva a una fibrosis. Un ejemplo claro es la destrucción tisular hepática como resultado de la cirrosis o de la hepatitis. Ningún cambio está determinado genéticamente y resulta, más bien, de la pérdida de sincronización funcional entre



los procesos bioquímicos y las estructuras macromoleculares que constituyen a la célula (Geddes y col 1996).

Cuando una célula sufre muerte por necrosis el contenido de su citoplasma se vacía al espacio extracelular, manifestando una gran cantidad de antígenos que el sistema inmune reconoce como ajenos y trata de eliminarlos. Durante el proceso se activan varios mecanismos del sistema inmune, como macrófagos y neutrófilos que liberan  $H_2O_2$  dañando cualquier célula con la que entran en contacto, el resultado de esto es la destrucción de muchas células que se encuentran en el tejido alrededor de ellas (Buke y cols, 1994)

Durante la muerte por necrosis el ADN se degrada por acción de endonucleasas y exonucleasas, y pierde su integridad, ya que al separarse en geles de agarosa se observa un barrido sin que parezcan bandas. El barrido muestra que en la muerte por necrosis el ADN se corta en fragmentos de muy variados tamaños.

Por el contrario, una característica que hasta ahora se considera exclusiva de la apoptosis, es el rompimiento del ADN en las regiones internucleosomales. De tal manera que cuando se somete una separación por electroforesis en un gel de agarosa, es posible ver un patrón de bandas muy peculiar que se conoce como patrón en escalera. Esto revela que durante la muerte por apoptosis los fragmentos producidos son múltiplos de 200 pares de bases, que corresponden a la cantidad de ADN que se enrolla en cada nucleosoma. Los nucleosomas son elementos estructurales de la cromatina, que están formadas por un núcleo de histonas rodeadas por dos asas de ADN (Mac Manus, 1999).

Durante la apoptosis se promueve la activación de proteasas específicas, que inician la degradación de las proteínas de filamentos intermedios de la matriz nuclear. Se cree que debido a que la cromatina se encuentra adosada a estos sitios, la fragmentación de los mismos promueve la desorganización de la cromatina (Peitsch y cols 1994, Jun y cols 1998).

La activación posterior de endonucleasas que tienen acceso a las regiones de ADN entre los nucleosomas hidrolizan el ADN. Su fragmentación considera como un elemento diagnóstico de la muerte celular por apoptosis, con todo su ausencia no significa una carencia de la misma. Por ejemplo, el proceso puede suceder de manera rápida y el ADN se hidroliza completamente. Por otra parte, es importante considerar que las células no mueren de manera sincrónica y que por tanto en un cierto tiempo esta fragmentación puede estar presente sólo en una cantidad pequeña de la población celular bajo estudio. Así se puede explicar por que el documentar la fragmentación del ADN llega a ser más difícil de lo que originalmente se pensaba (Hayashi y cols 1999).

### **Encendido y apagado del programa de muerte**

La muerte celular programada es un mecanismo mediante el cual las células se seleccionan, esta selección está determinada por los factores microambientales alrededor de la célula que determinan si debe vivir o morir y el momento que esto debe ocurrir.

El estudio de distintos sistemas celulares en los que ocurre muerte por apoptosis sugiere que existen dos formas principales de activación del programa de muerte. En algunos tipos celulares el programa está apagado y requiere de un estímulo externo para activarlo. Señales pertenecientes al grupo de citosinas, como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) o el ligando APO/FAS son los ejemplos prototípicos de señales que al unirse a sus receptores en las células blanco, activan el programa de muerte (Meldrum y cols. 1987).

Un segundo mecanismo de activación del programa de muerte, consiste en que su encendido forma parte de las características del estado de maduración o diferenciación de un linaje celular. En estos casos la muerte se evita por acción de factores de supervivencia, también llamados factores tróficos, que de encontrarse en el medio, bloquean la ejecución del programa de muerte. Tal es el caso de las neuronas dependientes del factor de crecimiento neuronal (NGF) (Zhang y cols. 2000).

Ciertos oncogenes y genes supresores de tumores participan en el mecanismo de muerte celular programada (Fig.3). La expresión de estos genes puede inducir apoptosis en algunos tipos de cáncer. Por lo tanto sugiere que la muerte celular programada es un mecanismo de defensa contra la transformación maligna (Allsopp 1993).

La protección que confiere la expresión del gen bcl-2 parece deberse a que su producto génico interfiere justo con los eventos de la fase de ejecución que lleva a la activación de caspasas adosadas en la membrana mitocondrial (Charlotte y cols., 1999).

PROMOTORES	INHIBIDORES
p53	bcl-xl
bcli-xs	bcl-w
Bax	mcl-1
Bak	ced-9
c-myc	E1 B 19 K
Bad	p35,
Nbk	crm A
Ced-3,4	EBV BHRF-1
R-ras	bag-1
CPP32	Dad-1
reaper	A1
TNF-r p55	bcl 2
Fas/APO1/CD95	IAP

Fig. 3 Genes promotores e inhibidores de apoptosis (Thatte 1997).

### Caspasas ejecutoras de la muerte celular por apoptosis

Son probablemente, las moléculas efectoras más importantes de la apoptosis. Son una familia de enzimas con trece miembros que tienen en común la presencia de cisteína en su centro activo y que efectúan el corte en el aminoácido Aspartato (Cisteinil-ASPartato específico-proteASAS) Fig.4. Y que se dividen en tres subfamilias. La familia de proteasas semejantes a enzimas convertidoras de interleucinas-1 $\beta$  (ICE, del inglés, Interleukin-1  $\beta$  converting enzyme), la subfamilia

CED-3 y la tercera subfamilia se compone de un sólo miembro, la caspasa 2 (Nedd2). Son sintetizadas como precursores inactivos que son activados por escisión autocatalítica o por otras proteasas (Yuan 1993). Actúan sobre un gran número de sustratos, entre ellas las proteínas del citoesqueleto, proteínas relacionadas con el ciclo celular, con la escisión y reparación de ADN, con la transcripción y traducción de señales. En la activación de otras caspasas (efectores) como iniciando los procesos que conducen a la degradación celular (iniciadoras). Todas las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato (Kumar y cols, 1996, Schulze-Osthoff y cols, 1998).

El cómo las caspasas contribuyen al proceso de muerte no está completamente comprendido, principalmente debido a que la mayoría de los sustratos conocidos han sido hallazgos fortuitos. Que sugieren que un subconjunto de caspasas es responsable de los cambios celulares que ocurren durante la apoptosis y provee una idea del mecanismo empleado (Stanislaw 1999; Schulz 1999).

Las caspasas contribuyen a la apoptosis a través del desensamble de la estructura celular, como lo ilustra la destrucción de la lámina nuclear. Que es una estructura rígida que tapiza internamente la membrana nuclear y está implicada en la organización de la cromatina (Weil 1996). La lámina está formada por polímeros de proteínas filamentosas intermedias. Durante la apoptosis las proteínas son clivadas en un sitio único por las caspasas, causando el colapso de la lámina y contribuyendo a la condensación de la cromatina (Samali 1999).

La observación de que los precursores de las caspasas son constitutivamente expresados (aún en neuronas), indica que la regulación de las caspasas es sofisticada y efectiva. Los complejos sistemas proteolíticos, que a menudo involucran una combinación de proteasas regulatorias, cofactores, retroalimentación y umbrales, que convergen para controlar la actividad de una proteasa efectora, que lleva adelante la función de todo el proceso.

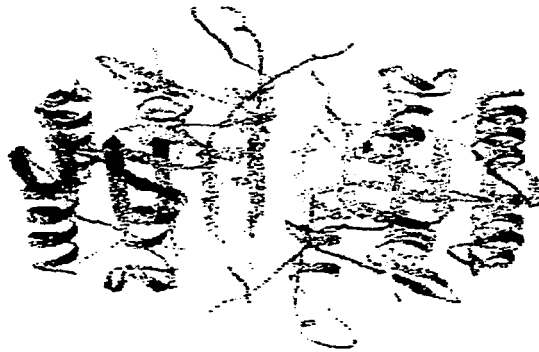


Fig.4 Estructura general de las caspasas mostrando en rojo el sitio catalítico

Esta intrincada regulación da cuenta de una característica espectacular de estos sistemas: mantienen a la proteasa efectora inactiva pero en respuesta de cantidades mínimas de un inductor apropiado, son capaces de activar grandes cantidades de ésta rápidamente. Dada la función de las caspasas como mediadores de muerte celular, la complejidad de su regulación podría rivalizar con la de los sistemas de complemento y de coagulación (Weil 1996, Wyllie 1980).

#### **Estrés oxidativo**

Además de la activación de la cascada de caspasas, durante la muerte por apoptosis se activan varios procesos bioquímicos que han sido considerados como vías paralelas que conducen a la muerte celular. A la activación de la cascada de caspasas se han asociado alteraciones en el funcionamiento mitocondrial, que incluyen una caída transitoria del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo C y a la producción de radicales libres. Por

una parte, la liberación de citocromo C es un paso indispensable en la activación de una segunda serie de caspasas (Rosenthal 1997). Por otra parte, las alteraciones que permiten la liberación de citocromo C afecta a la cadena respiratoria permitiendo un aumento en la generación de radicales libres. El aumento, de formas reactivas de oxígeno, crea un estrés oxidativo inespecífico que conduce al deterioro de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que por sí sólo puede conducir a la muerte celular (Jun, 1997).

Además de la activación de cadena de caspasas y estrés ocasionado por el oxígeno se han identificado otros procesos bioquímicos que llevan a la muerte. Por un lado se activa una esfingomielinasa que hidroliza esfingomielina produciendo Ceramida, que actúa como segundo mensajero capaz de inducir arresto o muerte celular por apoptosis, dependiendo del blanco celular. Por otra parte la activación de fosfolipasa del tipo A2 (PL-A2), en respuesta a estímulos apoptóticos como el TNF, produce un aumento en el metabolismo del ácido araquidónico que ha sido asociado a la muerte celular, posiblemente por la generación de radicales libres (Fortuna 1997).

En vista de que la apoptosis está controlada por información genética, está sujeto al efecto de mutaciones, las que junto con las presiones selectivas del medio constituyen la materia prima de la evolución. Las alteraciones en la regulación del proceso de muerte, podrían resultar en un retardo o ausencia de muerte, dejando células supernumerarias abiertas a la posibilidad de formar nuevas interacciones celulares y adquirir nuevas funciones y enfrentar nuevas demandas.

Una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos que llevan a la muerte celular, será de gran utilidad para entender y posiblemente tratar entidades patológicas como; enfermedades neurodegenerativas, epilepsia, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, alteraciones hematopoyéticas, neoplasias y por supuesto isquemia cerebral y episodios de isquemia-reperfundición.

## Antecedentes

La isquemia cerebral esta originada por la disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel tal que interfiere con la función del sistema nervioso. Este decremento es el resultado de la alteración del equilibrio de numerosos factores hemodinámicos. Puede conducir a la aparición, en las neuronas y en la glia, de una serie concatenada de alteraciones metabólicas y bioquímicas que concluirán con la necrosis celular (Namura, 1998).

Un hecho de importancia observado recientemente, es el papel que juega la apoptosis en la isquemia cerebral. En zonas periféricas de los infartos cerebrales se han observado células en apoptosis ( Linnik 1993). Esto se demostró gracias a la presencia de ciertos signos característicos de la apoptosis. Durante mucho tiempo y sobre todo en el caso del cerebro, se consideró que la isquemia hipóxica es un tipo de necrosis.

El cerebro consume un tercio de su energía en el mantenimiento de la transmisión sináptica, otro tercio para el transporte de iones y otra tercera parte en la preservación de su integridad estructural. Cuando decae la perfusión cerebral, se alteran progresivamente sus funciones hasta producir la muerte celular. Pese a esto, no todas las neuronas responden de forma similar al insulto isquémico y existe una vulnerabilidad selectiva en razón de la densidad neuronal, de la diferente perfusión regional y distinto metabolismo. Las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo, núcleo amigdalino y cerebelo son más sensibles a la isquemia y sufren cambios estructurales de manera más precoz que las neuronas de otras localizaciones y que las células gliales (Murayama y cols., 1990).

En contraste, las alteraciones isquémicas de la función cerebral descritas que aparecen inmediatamente después de la oclusión vascular, el desarrollo de lesiones morfológicas irreversibles requiere algún tiempo. Por lo tanto, las alteraciones funcionales aparecen inmediatamente después del comienzo de la

isquemia y son únicamente dependiente del flujo. Mientras que las alteraciones estructurales requieren tiempo y dependen del flujo sanguíneo (Castillo, 1995).

La obstrucción de un vaso sanguíneo cerebral ocasiona un gradiente isquémico que da lugar a una isquemia intensa en el centro del territorio vascular y a una isquemia menos pronunciada en la periferia del mismo. Las células del núcleo isquémico, con un flujo inferior al umbral del infarto, mueren en pocos minutos. En la zona periférica, con un flujo por debajo del umbral de isquemia, se originan alteraciones de la actividad funcional de las neuronas, pero con conservación de una actividad metabólica mínima que preserva su integridad estructural durante algún tiempo. Esta zona se ha denominado penumbra isquémica. En esta área el tejido resulta dañado, el mecanismo de autorregulación se altera, la reactividad al anhídrido carbónico se mantiene parcialmente, la transmisión sináptica y el contenido de ATP son normales y se produce una disminución en el contenido de glucosa. Lo que conduce a la aparición de síntomas neurológicos, pero no son daños irreversibles (Ginsberg y cols., 1994).

El edema que aparece durante la isquemia cerebral es el resultado de la acumulación de líquido en el interior de las células, del intersticio celular o de ambos. En el primer caso, recibe el nombre de edema citotóxico y en el segundo, de edema cerebral vasogénico. El edema cerebral isquémico es el resultado de una compleja combinación de mecanismos citotóxicos y vasogénicos que dependen, del tipo, extensión, duración e intensidad de la isquemia cerebral (Hatashita y cols., 1990).

La glía y las neuronas son más sensibles a la isquemia que el endotelio capilar, por lo que el edema cerebral isquémico es inicialmente citotóxico y se origina por dos mecanismos: alteración de la permeabilidad celular y aumento de la osmolaridad intracelular. La alteración de la permeabilidad celular es consecuencia del fallo energético incapaz de mantener las bombas de intercambio iónico. La osmolaridad aumenta como consecuencia de la liberación de glutamato



y de la acumulación de productos de degradación. Ambos mecanismos originan también un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, con incorporación de sodio y agua en el interior de las células.

El edema agrava el proceso inicial isquémico cerebral por varios mecanismos: interfiere en la homeostasis del agua y electrolitos en el parénquima cerebral, altera las fibras mielinizadas y tiene un efecto volumétrico que causa compresión de la microcirculación, eleva la presión intracraneal y origina hernias intracerebrales. Factores que son responsables de la progresión del edema y del daño cerebral inicial, que en casos extremos, puede llegar a originar una isquemia global y muerte cerebral (Castillo, 2000).

### **Justificación**

La enfermedad vascular cerebral representa la segunda causa de mortalidad y una de las principales causas de discapacidad en el mundo. La enfermedad isquémica constituye aproximadamente el 80% de todos los casos (WHO 2002).

Es necesario llegar al concepto de una ventana terapéutica, es decir, un periodo de tiempo durante el cual la aplicación de medidas específicas permita evitar la muerte de las células en riesgo. La investigación del daño celular inducido por isquemia es un punto muy importante a tratar ya que, a pesar de los estudios que se han realizado hasta ahora, no se ha logrado llegar a un acuerdo entre las evidencias moleculares y los hallazgos histológicos, del daño celular producido por la isquemia cerebral.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

-Estudiar el daño celular que produce la isquemia cerebral focal en un modelo de rata.

### **Objetivos Particulares**

-Analizar el daño celular que se produce por Isquemia cerebral focal, en diferentes regiones del cerebro.

-Encontrar el tiempo mínimo de isquemia en el cual se presentan los daños

-Estudiar con el uso de técnicas de biología molecular el daño que ocurre en el ADN en distintos tiempos de isquemia.

-Realizar la correlación entre las evidencias moleculares e histológicas

### **Hipótesis**

El daño celular es proporcional al tiempo de isquemia, por lo que es posible localizar el inicio del daño ocasionado por la isquemia cerebral focal sin perfusión, en un rango de tiempo de 5 a 15 minutos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Inducción de isquemia

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de aproximadamente 300 g de peso, se sometieron a isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo, por oclusión de la arteria cerebral media, mediante la introducción intraluminal de una sutura de nylon 3-0 a través de la arteria carótida interna hasta bloquear el flujo de la arteria cerebral media (Zea y cols 1989). La inducción de isquemia se realizó durante los siguientes tiempos: 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 30 y 60 minutos.

La rata fue anestesiada con halotano (Fluotane Astra Zeneca) al 2% con oxígeno (v/v) en una máquina Ohmeda Fluotec 3, y se colocó en decúbito dorsal. Bajo un microscopio quirúrgico (Olympus MTX), fue expuesta la arteria carótida común izquierda a través de una incisión en la línea media que va del manubrio del esternón hacia la región del músculo transverso mandibularis, a continuación las glándulas salivales fueron separadas con ayuda de unos retractores posicionándonos entre el músculo digástrico y el esternocleidomastoideo, se incidió en el músculo homohioideo el cual fue dividido, exponiendo la arteria carótida común. Se efectuó disección cortante de la carótida común hasta el asa del hipogloso. Se identificó la bifurcación carotídea, la carótida externa y sus ramas occipital y tiroidea las cuales fueron disecadas y electrocoaguladas. La carótida externa fue disecada en su extremo más distal y electrocoagulada. La carótida interna fue aislada cuidadosamente del nervio vago adyacente. Después de esta disección, se identificó el origen de la arteria Pterigopalatina y se ligó justo en la bifurcación con hilo de nylon de 4-00.

En este momento, la carótida interna es la única rama extracraneal que distribuye sangre a la arteria cerebral media.

A continuación se colocó un nudo suave de sutura 6-00 alrededor de la carótida externa y un clip transitorio ocluyó el FSC desde el origen de la misma. Un fragmento de dos centímetros de longitud de sutura de nylon 3-00 con punta redondeada fue introducido en ella, el nudo suave fue apretado alrededor del nylon intraluminal para prevenir el sangrado y el clip transitorio fue removido. La sutura de nylon se avanzó suavemente desde el muñón de la carótida externa hasta la carótida interna, se continuo hasta que la sutura alcanza la arteria cerebral media, cerrando el flujo de sangre de ésta y de las arterias carótida interna, cerebral anterior y cerebral posterior (Fig. 5).

Para obtener los Controles de manipulación quirúrgica (*Sham*) se llevó acabo todo el proceso quirúrgico sin la introducción de la sutura de nylon de esta manera no se indujo isquemia cerebral. Los controles fueron ratas que se sacrificaron sin someterlas al procedimiento ya descrito.

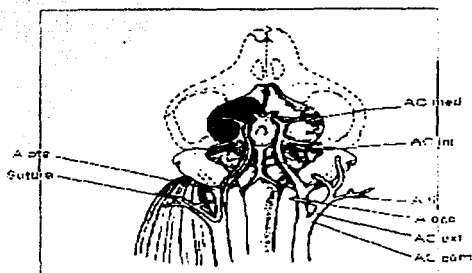


Fig. 5 Esquema de introducción de sutura de nylon hasta alcanzar la arteria cerebral media (AC med), Arteria Carotida interna (AC int), Arteria tiroidea (A tir), Arteria occipital (A occ), Arteria Carotida externa (AC ext), Arteria Carotida común (AC com), Arteria pterigopalatina (A pte) (Zea y cols 1989)

## **Procesamiento de material biológico**

### **Fijación del tejido**

El animal se fijó por perfusión vía intracardiaca haciendo pasar paraformaldehído al 4% en PBS 0.01M pH7.2 a través de la vena cava. Posteriormente se extrajo el cerebro, y se colocó en fijador frío por una hora y se seccionaron las regiones a estudiar: lóbulos Frontal, Parietal, Occipital e Hipocampo, las cuales se mantuvieron en fijación por otras 18 horas a 4°C transcurrido este tiempo fueron deshidratadas en alcoholes graduales, en un procesador automático de tejidos (Histokinette 2000, Reichert-Jung, American Optical), se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótomo (Anexo I).

### **Hematoxilina & Eosina**

Los cortes fueron desparafinados en Xilol, hidratados en alcoholes graduales, teñidos con la técnica de Hematoxilina & Eosina (Ulrika, 1994) y montadas en resina Polimount (Polyscience). Las preparaciones fueron observadas bajo un microscopio óptico Olympus CH2 (Anexo II).

### **Extracción de ADN**

Ratas sometidas a isquemia cerebral focal de 12 y 15 min. así como controles y sham, fueron sacrificadas mediante una punción cardiaca de 1 ml de Pentobarbital sódico de uso veterinario, enseguida fue extraído el cerebro y se tomaron muestras de aproximadamente 500 mg de las diferentes zonas en estudio, las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas en un mortero hasta obtener un polvo fino que fue suspendido en 1.2 ml de amortiguador de digestión, y cada una de las muestras fueron incubadas a 37°C por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se agregó a la muestra un volumen igual de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamilico (25-24-1) y se centrifugó a 1700 g. por 10 min. a temperatura

ambiente. La extracción se realizó dos veces. Después de la centrifugación se tomó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo adicionando ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y dos volúmenes de etanol al 100%, y se centrifugó por 2 min. a 1700 g. obteniéndose una pastilla que se enjuagó con etanol al 70% la cual se centrifugó nuevamente por 2 min el alcohol fue decantado y la muestra se secó al aire por 3 min (es importante no dejar que se seque demasiado o será muy difícil que se disuelva) por último el ADN se disolvió en 20 µl de amortiguador Tris-EDTA (TE 10 mM pH 7.4). Así es posible almacenarlo por varios meses a 4°C (Anexo III).

## **LM-PCR**

### **Link Mediated-PCR**

Durante la apoptosis, endonucleasas celulares rompen el ADN entre nucleosomas produciendo fragmentos de varias longitudes en múltiplos de 180-200 pares de bases (Arends y cols 1992). Cuando son sometidos a electroforesis en un gel de agarosa estos fragmentos aparecen como una escalera nucleosomal, propia de células apoptóticas. Cuando es poco el tejido o las células con estas características, las marcas no son visibles o tienen poca definición, por lo que se aplica la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar la señal. Para realizar esto se utilizó el Kit ApoAlert™ LM-PCR Ladder Assay (Clontech), con el cual se realizó lo siguiente.

Se unieron adaptadores a los fragmentos de ADN mezclando de 4 a 6 µl de ADN, aproximadamente 0.5 µg, 35 µl de la mezcla de ligación del kit y agua estéril hasta alcanzar un volumen total de 70 µl, esta mezcla se incubó a 55°C por 15 min. la temperatura se redujo paulatinamente hasta 10 °C en el lapso de una hora (Rampa), en un PCR Perkin Elmer ADN Thermal Cycler 480, una vez transcurrida esta se agregó 1µl de T<sub>4</sub> DNAligasa, y esta mezcla se incubó por 16 horas a 16°C.

La amplificación por PCR fue realizada agregando 5  $\mu$ l de ADN, 10 ml de LM-PCR mix, 2  $\mu$ l de DNAPolimerasa y agua grado PCR llegando a un volumen total de 100  $\mu$ l esta mezcla se sometió a PCR en un termociclador, Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400.

El control negativo se preparó agregando la mezcla de ligación sin ADN genómico; para el control positivo se agregó, 2.5  $\mu$ l de ADN de Timo de cordero.

El resultado del PCR fue corrido en un gel de agarosa al 2% en Amortiguador TAE, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Anexo III).

### **Técnica de TUNEL**

Terminal deoxinucleotidil transferasa mediated dUTP Nick end labeling

El rompimiento del ADN genómico durante la apoptosis presenta fragmentos de alto y bajo peso molecular, estos fragmentos pueden ser identificados por marcaje de los extremos 3'-OH terminal con nucleótidos intensos y una reacción enzimática catalizada por la deoxinucleotidiltransferasa terminal, que polimeriza los nucleótidos en el extremo terminal, al estar intensos con fluoresceína los polímeros pueden ser detectados por microscopia de fluorescencia.

De las muestras de las diferentes regiones cerebrales ya incluidas en parafina, se obtuvieron cortes de 3  $\mu$ m de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos tratados con silano desparafinados e hidratados. Los tejidos fueron sometidos a un proceso de permeabilización para permitir el paso libre de los reactivos al núcleo celular, que consistió en sumergir las laminillas en amortiguador de citratos en un vaso de Koplring de polipropileno en baño María, sometido a 5 min. de irradiación en un horno de microondas a 750 Watts, cuidando que el amortiguador no se evaporara. Las laminillas se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se lavaron con PBS en dos ocasiones por 3 min. y se incubaron con Proteinasa K (20  $\mu$ g/ml) por 15 min. en una cámara húmeda a temperatura ambiente las laminillas se enjuagaron con PBS en 2 cambios de 3 min.

Por último, se aplicó la solución de permeabilización por 2 min. en hielo y se enjuagaron con PBS, las secciones se secaron muy bien alrededor para evitar que los reactivos se diluyeran. Se adicionó la mezcla de TUNEL contenida en el kit "In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein" (Boehringer Mannheim) a las laminillas y fueron incubadas en oscuridad en una cámara húmeda por 30 min. a 37°C los cortes se enjuagaron como ya se menciona, se contratificaron los núcleos con Yoduro de Propidio (1:60 en PBS) por 15 minutos y fueron enjuagadas, a continuación se montaron con Vectashield Vector, el cubre objetos se selló con barniz de uñas. Como control negativo se utilizó una muestra a la que se le agregó la mezcla de TUNEL sin la enzima (Transferasa terminal), como control positivo se uso una laminilla que fue sometida a una digestión enzimática con Dnasa I durante 10 minutos en cámara húmeda (Anexo IV).

#### **Procesamiento de muestras para microscopía electrónica**

Las ratas isquémicas, Control y Sham fueron fijadas por perfusión con glutaraldehído al 2.5% - paraformaldehído 4% en PBS. Se obtuvieron las regiones en estudio, fueron fijadas por inmersión durante 1 hora y, se cortaron en fragmentos de 3 mm<sup>3</sup> y se sumergieron en fijador durante 1 hora a 4°C, una vez transcurrido este tiempo se enjuagaron en PBS por 15 min., se postfijó con tetraóxido de osmio al 0.5% en PBS por 1 hora. Una vez más se enjuagaron, posteriormente se deshidrataron en alcoholes graduales y se preincluyeron en una mezcla 1:1 de acetona absoluta-Epon durante 24 horas a 4°C, se incluyeron en resina epóxica y se polimerizaron a 60°C durante 12 a 18.

Se obtuvieron cortes semifinos de 1µm de grosor, que se tiñeron con Azul de Toluidina y fueron observados bajo el microscopio óptico. Se obtuvieron cortes ultrafinos el patrón gris-plata del espectro de los colores de interferencia, fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo metales pesados y observados en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10-A (Anexo V).



## **Resultados**

### **Hematoxilina & Eosina**

El estudio microscópico con la tinción de H & E nos permite valorar desde perspectivas panorámicas el tipo de tejido, patología y acompañantes morfológicos, (hemorragia, necrosis, inflamación etc.), es el estudio básico desde el punto de vista morfológico, esto nos permitió reconocer cambios en las muestras observadas.

### **Controles**

Se encontraron neuronas con un núcleo prominente redondo de color azul con un nucléolo muy intenso así como un citoplasma de tono rosado con límites de membranas nucleares y citoplásmicos bien definidos y regulares los astrocitos presentaron tamaño normal (Fig. 6).

### **5 minutos**

En el lóbulo frontal se observaron células con citoplasma y núcleos conservados, no obstante se encontró leve de edema vasogénico caracterizado por incremento en el espacio entre el vaso y el tejido adyacente. En el lóbulo parietal, las células presentan núcleos conservados, con una tinción de hematoxilina adecuada y citoplasma teñido por la eosina, y se sigue presentando leve de edema vasogénico. En el lóbulo occipital se presentaron estos signos pero las células de la glía presentaron daño por hipoxia. Estas características también se encontraron en la región del hipocampo en el que la glía mostró cambios que consistieron en células con encogimiento, basofilia, y un intenso edema citotóxico.

### **10 minutos**

A este tiempo en el lóbulo frontal, en las células de la glia se observó engorgamiento nuclear y citoplásmico, con basofilia marcada. Se notó edema citotóxico y se pudo ver también un aumento del edema vasogénico. En el lóbulo parietal se observan los mismos cambios a nivel de la microglia, indicando muerte celular por necrosis. En el lóbulo occipital se encontró un incremento de áreas de necrosis. En el caso de la región del hipocampo en las regiones que rodean al mismo se presentaron áreas de necrosis, con los signos ya descritos en los lóbulos frontal, parietal y occipital pero este daño aún no se hizo evidente en las células que lo conforman.

### **15 minutos**

La inducción de isquemia cerebral por este periodo de tiempo, produjo daño generalizado en el lóbulo frontal (Fig. 7A), en donde se encontraron conjuntos de células presentando marcada picnosis y edema citotóxico, sin embargo entre estas zonas de daño se encontraron regiones de características preservadas, en donde se observaron células eosinofílicas, con una ligera disminución en el volumen citoplásmico, ligera alteración de la membrana nuclear y ausencia de edema citotóxico. En el lóbulo parietal (Fig. 7B) se repitió este patrón de alteraciones, pero, el deterioro aumentó en la región occipital (Fig. 7C), en la cual las células con eosinofilia se presentaron en mayor número. En la zona del hipocampo, en comparación con lo observado a los 10 minutos los cambios fueron más intensos pudiéndose distinguir células que presentaban las mismas alteraciones encontradas en las otras regiones analizadas (Fig. 7D). Estas observaciones nos dieron la pauta para realizar un análisis de las alteraciones que produce la isquemia cerebral en tiempos intermedios (11, 12, 13, y 14 minutos), con el fin de observar los cambios histológicos que se van presentando que permitan encontrar indicios del momento en el que se comienzan a hacer evidentes las diferencias morfológicas que fueron encontradas en el lóbulo

occipital y en la región del hipocampo. En el occipital los cambios consistieron en la presencia de escasas células de la glia con pérdida del volumen citoplásmico y basofilia marcada, en este momento también se encontraron neuronas de color rosado resultado de la eosinofilia y ausencia de edema citotóxico. Estos resultados coinciden con los hallazgos en el hipocampo en las observaciones de tiempos intermedios.

### **12 minutos**

Las observaciones más importantes fueron encontradas al minuto 12 en el que se encontraron células de la glia que mostraron pérdida del volumen citoplásmico y basofilia marcada, así como zonas de necrosis ejemplificadas por las neuronas, formando grupos de células que presentaron cambios propios de hipoxia como una tinción basofílica, pérdida del volumen citoplásmico y edema citotóxico, las características se mantuvieron en la zona del hipocampo y el lóbulo occipital, pero algo que también compartían estas regiones era la presencia de células con características diferentes como eosinofilia muy marcada, citoplasma conservado, membranas nucleares y citoplásmicas en buen estado y ausencia de edema citotóxico, opuesto a la necrosis. Las células con las características mencionadas se presentaron de manera esporádica por la superficie del tejido. Las observaciones parecían indicar que en este momento se estaban presentando los primeros signos de cambio no necrótico lo cual hizo pensar en cambios apoptóticos (Fig. 8).

## LM-PCR

Para confirmar la presencia de apoptosis se busco el rompimiento característico del ADN para lo cual se amplifico la señal con ayuda del LM-PCR. A los 12 y 15 minutos en la región del hipocampo se encontró el patrón característico del rompimiento del ADN en escalera. Al compararlo con el marcador de peso molecular, mostró bandas con pesos moleculares correspondientes a múltiplos de 180 a 200 pares de bases (Fig. 9).

## TUNEL

La incorporación de nucleótidos intensos con fluoresceína en los extremos 3'-OH mediada por la Tdt, mostró a los 15 minutos en la región occipital una señal positiva denotada por el marcaje de células aisladas, lo que mostró a la cromatina adosada a la periferia del núcleo presentando un patrón de anillo ya que el centro del núcleo es de color negro y sólo fluoresce la cara interna de la membrana nuclear.

Para la región occipital en el minuto 12 no se encontró una señal positiva, está sólo se presento en la región del hipocampo donde las señales se asemejaban mucho a los vistos en los 15 minutos, con la salvedad de que la señal se presenta en menos células (Fig 10).

## Microscopia electrónica

En los cortes semifinos se observaron condensaciones ligeras de la cromatina en la cara interna de la membrana nuclear, la cual presenta también alteraciones al igual que la membrana celular en las regiones hipocampo y occipital a los 12 y 15 minutos. En los cortes ultrafinos contrastados con uranilo-plomo se pudo ver que las condensaciones de la cromatina en la membrana nuclear presentaban un patrón de "Collar de perlas", junto con esto se pudo observar el buen estado de mitocondrias así como de retículo endoplásmico y otros organelos lo cual se demostró al compararlas con las muestras control y Sham (Fig.11).

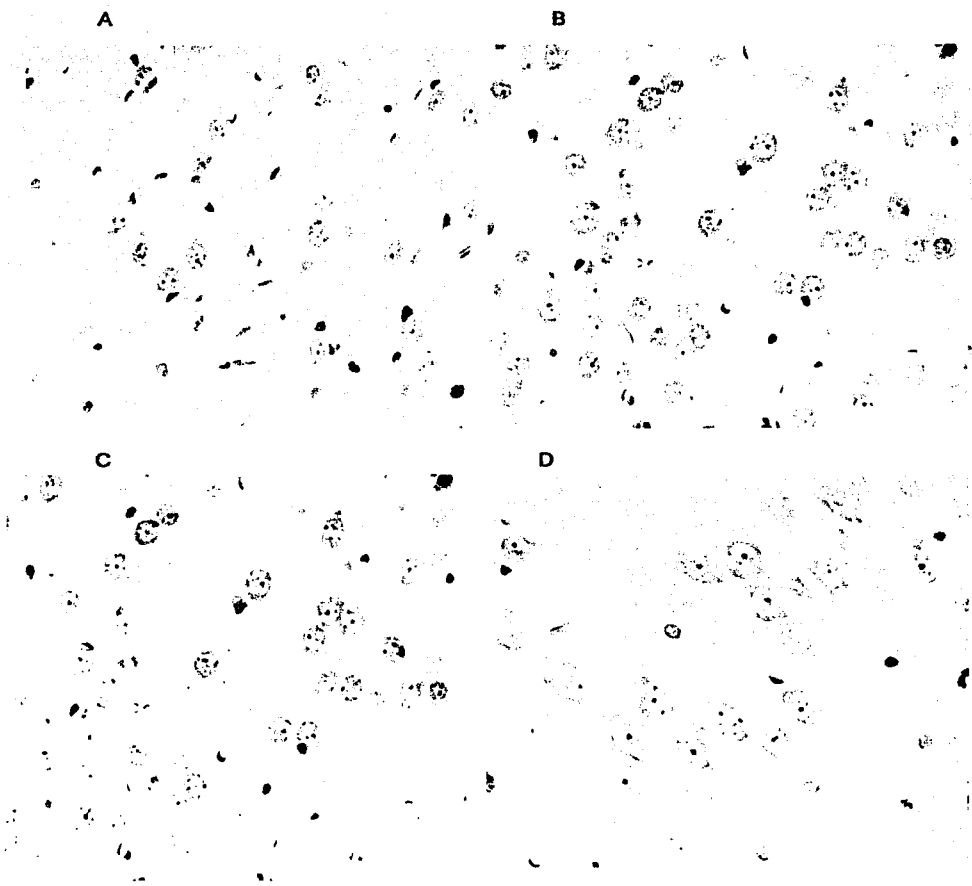


Fig 6. Micrografías 40X de las cuatro regiones a estudiar teñidas con H & E. A) Lóbulo frontal, B) Lóbulo parietal, C) Lóbulo occipital, D) Zona del hipocampo. Se aprecian núcleos de gran tamaño bien definidos con membranas celulares muy regulares.

29-1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

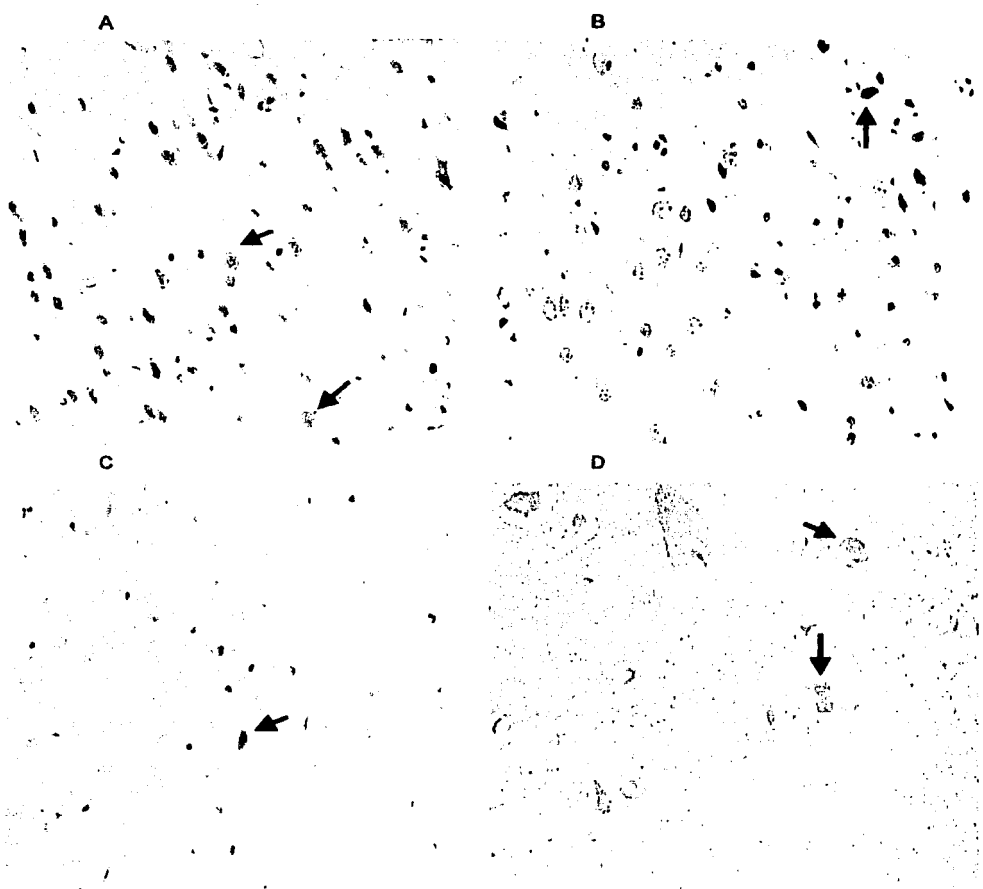


Fig. 7 Micrografías 40 X A) Lóbulo frontal, B) Lóbulo parietal, C) Lóbulo occipital y D) Región del hipocampo. En general se ven células picnóticas con lesiones edematosas, también se presentan células eosinófilas con ligera pérdida de volumen citoplásmico (Flechas).

29-2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

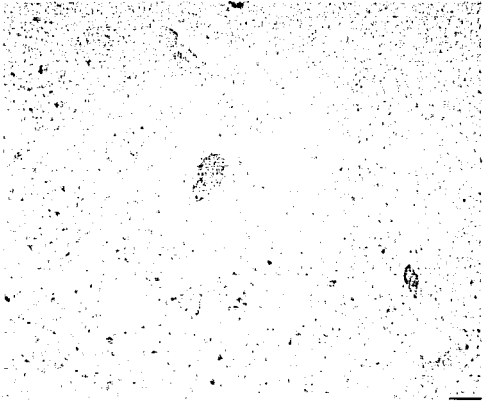
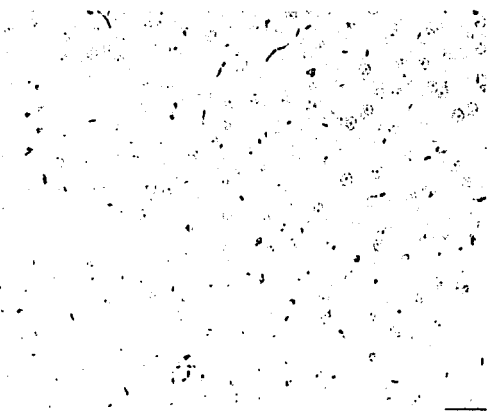
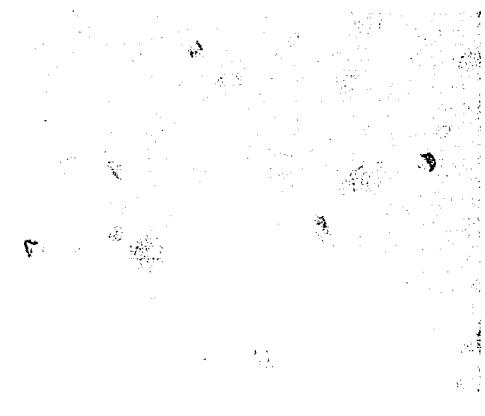
**A****B****C****D**

Fig 8. A y B corresponden a la zona del hipocampo y C y D al lóbulo occipital en el minuto 12 de isquemia y tomadas a 20X y 40X respectivamente en el detalle podemos ver las claras diferencias de tinción entre las células normales y las presuntas apoptóticas, así como irregularidades en membranas nucleares y citoplásmicas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

29-3

PM C- C+ Hc Hs H12 H15



Fig.9 Corrimiento de LM-PCR en gel de agarosa que deja ver los pedacitos formados por el rompimiento del ADN, el marcador de peso molecular muestra que estos se encuentran en las regiones de múltiplos de 200 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



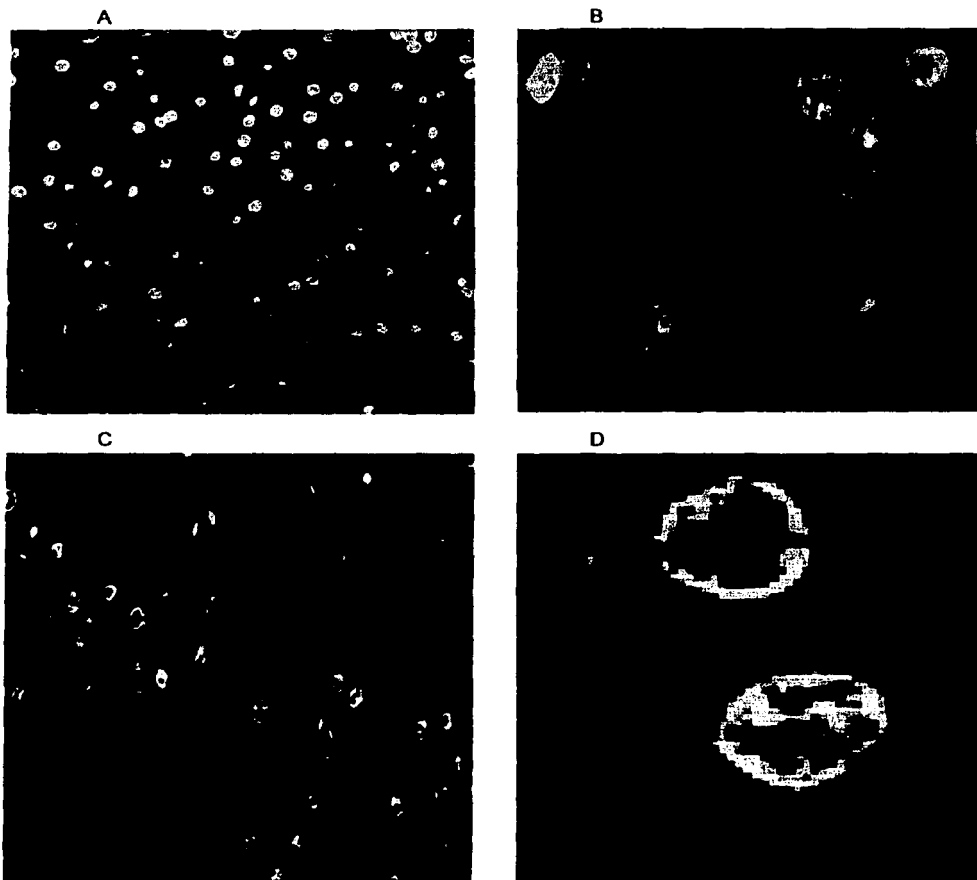
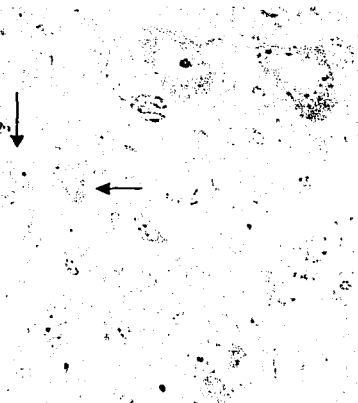


Fig.10 Células positivas a la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína. A)Control (+) tratado con Dnasa, B)Lóbulo occipital 15 min de isquemia C)Zona del hipocampo a 12 min de isquemia, D)Detalle de hipocampo. Es posible apreciar la fluorescencia en anillo correspondiente a la condensación de la cromatina.

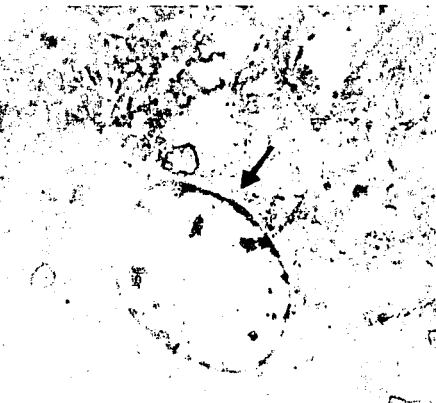
29-5

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

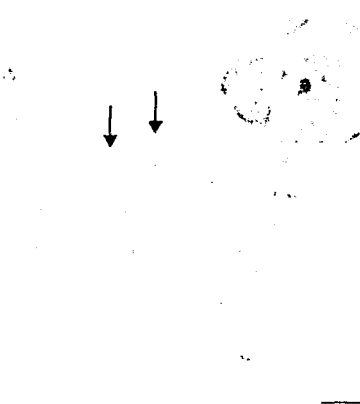
A



B



C



D



Fig.11 (A,C) Cortes de  $1\ \mu$  teñidos con azul de toluidina de el lóbulo occipital y la región del hipocampo en los cuales podemos ver condensaciones de la cromatina así como irregularidades en las membranas. (B,D) Cortes ultrafinos de las mismas regiones en las que se observa un patrón de condensación de la cromatina similar a un collar de perlas. En D es posible ver un retículo endoplásmico dilatado (flecha).

29-6

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión y Conclusiones

La isquemia cerebral focal es producto de una obstrucción arterial-trombótica o embólica, que habitualmente nunca es completa, ya que existe un aporte colateral más o menos importante. Lo que crea un área denominada de penumbra isquémica, en la que si bien el flujo cerebral es menor al normal aún se preserva la capacidad metabólica de las células neuronales. También permite conservar las neuronas y si se supera la causa de la trombosis, recuperarlas. Ya pasado un tiempo comprendido entre 30 y 60 minutos la lesión se hace irreversible (Naveiro y cols. 1998).

En la realización del proyecto, el modelo del bloqueo del flujo de sangre implica una técnica poco invasiva, que reproduce de manera fiel el efecto de una ataque isquémico, acompañado del daño neuronal relacionado con el (Zea y cols. 1989). Las señales que sugieren apoptosis aparecen en los modelos animales de cerebro isquémico global (Papas y cols.1992; Shigeno y cols.1990; Tartosa y cols.1994) y focal (Linnik y cols.1995; Du y cols.1996) siempre a tiempos largos y en casi todas las ocasiones con reperusión, lo cual incrementa el daño el daño.

El presente trabajo fue realizado para investigar la probable participación de la apoptosis como respuesta al daño isquémico y el tiempo mínimo en el cual se presentan estos cambios. Usando la técnica de hematoxilina y eosina se logró identificar los cambios que nos hacen pensar en la presencia de apoptosis como la tinción diferencial que presentan las células apoptóticas y los cambios en la integridad membranal y cambios en el núcleo (Yi y cols. 1997), sin embargo, esto fué corroborado con técnicas más sensibles para poder correlacionar las observaciones histológicas con las técnicas moleculares.

Nuestros resultados con la técnica de LM-PCR mostraron una aparición del patrón característico en escalera resultado del rompimiento del ADN en las regiones

internucleosómicas, a los 12 y 15 minutos en la región del hipocampo y no se presentó para los lóbulos occipitales de los mismos tiempos, esto se atribuye a que en el occipital de 12 minutos la presencia de células con características apoptóticas posiblemente no son suficientes para la reacción del kit.

Sabiendo que una de las señales más características de la apoptosis es el rompimiento internucleosomal del ADN en fragmentos de 200 pb. Estos fragmentos pueden ser vistos de manera directa por la técnica de TUNEL (Iwai y cols. 1995; MacManus y cols. 1999; Niwa y cols. 1995). Encontramos en la región del hipocampo a los 12 minutos y en el hipocampo y occipital a los 15 minutos un marcaje positivo que se piensa se debe a que la región del hipocampo recibe poco riego sanguíneo colateral, siendo alimentado principalmente por la arteria cerebral media, de la misma manera parece ser que hay una relación de proximidad con el occipital lo que promueve una extensión del área de daño que se presenta un poco después.

Aparte de los cambios moleculares, las células apoptóticas presentan cambios morfológicos muy característicos como el encogimiento celular y la condensación de la cromatina entre otros. Al observar las condensaciones de la cromatina con el apoyo de la microscopía electrónica nos dimos cuenta de que presentaban un patrón de collar de perlas en las partes internas de la membrana nuclear así como conservación de la integridad de los organelos y de la membrana celular, lo cual nos muestra un proceso organizado de degradación (Brown y col. 1972).

Nuestro estudio sugiere que los daños por necrosis se inician prácticamente con la aparición del infarto. Opuesto a lo sugerido hasta la fecha, el daño por apoptosis se presenta en tiempos mucho más tempranos. El mayor aporte de nuestro trabajo es que a los 12 y 15 minutos de isquemia cerebral focal, en el lóbulo occipital y la zona del hipocampo encontramos daño al ADN y células apoptóticas junto con áreas de necrosis. Nuestros datos proveen evidencia directa de presencia de apoptosis después de un corto periodo de isquemia cerebral focal.

Otro dato importante es la presencia conjunta de necrosis y apoptosis y en una relación muy cercana en nuestras observaciones. La conjunción de estado necrótico y apoptótico nos sugiere que pueden tener parte común en las señales del microambiente extracelular, y que las rutas de apoptosis y necrosis neuronal pueden no ser tan distintas e incluso que un cruce de vías de señalización e inducción pueden existir *In vivo* (Yi y cols. 1997).

Estos datos aportan la posibilidad de que la apoptosis contribuya de manera importante en el daño celular en el área de infarto cerebral en ratas sujetas a un tiempo corto de isquemia cerebral focal sin reperusión.

No obstante el diseño experimental no nos permite determinar cual es el inductor de estos daños. Por ello es necesario realizar un estudio bioquímico de las distintas rutas para determinar cual es el papel que juegan en este proceso: el estrés oxidativo, la expresión de genes y el procesamiento postraducciona de proteínas, así como la potenciación de los daños resultado del daño isquemia reperusión, y así poder esclarecer su papel en las diferentes formas de muerte neuronal.

## ANEXOS

### Anexo I

#### Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4

Solución Ácida (A) Fosfato Ácido de sodio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (PM 137.99)

13.79 g en 500 ml

Solución Básica (B) Fosfato Básico de sodio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (PM 268.07)

26.80 g en 500 ml

Añadir la solución Ácida a la Básica lentamente hasta obtener un pH de 7.4 NUNCA alreves.

#### Amortiguador de fosfatos salinos (PBS)

Diluir 1:1 el amortiguador de fosfatos 0.2 M y agregar 0.8 g de NaCl por cada 100ml

#### Paraformaldehído 4%

4 g de Paraformaldehído se adicionan por cada 100 ml de amortiguador se agitan en plancha caliente (no más de 60 °C , ya que si se excede esta temperatura el Paraformaldehído se transforma en Aldehído) y dentro de una campana hasta que quede transparente, en caso de que la solución quede turbia se agregan unas gotas de NaOH 1 M, después se enfría a temperatura ambiente y se almacena a 4 °C.

#### Procesamiento de material biológico

$\text{H}_2\text{O}$

Alcohol 70%

Alcohol 80%

Alcohol 96%

Alcohol 96%

Alcohol 100%

Alcohol 100%

Xilol/Alcohol 1:1

2 baños de Xilol 100%

2 baños de Parafina

Los tejidos deben de sumergirse una hora en cada uno de ellos.

## **Anexo II**

### **Hematoxilina & Eosina**

Desparafinar e Hidratar

Dos baños de Xilol de 10 min.

Xilol /alcohol absoluto 1:1 por 3 min.

Dos baños de alcohol absoluto por 3 min.

Dos baños de alcohol 96% por 3 min.

Alcohol 80% por 3 min.

Agua corriente por 3 min.

### **Preparación de Hematoxilina de Gill**

H<sub>2</sub>O destilada 730 ml

Etilenglicol 250 ml

Hematoxilina anhidra polvo 2 gr

Yodato de sodio 10 – 200 mg

Sulfato de aluminio 17.6 gr

Ac. Acético glacial 2 ml

Filtrar

### **Preparación de Eosina**

Solución Madre

Eosina 1 gr

H<sub>2</sub>O 20 ml

Etanol 96% 80 ml

Solución de trabajo

Una parte de solución madre

Tres partes de Etanol 96 %

1 ml de Ac. Acético

### **Deshidratar**

Agua corriente por 3 min.

Alcohol 80% por 3 min.

Dos baños de Alcohol 96% por 3 min.

Dos baños de Alcohol Absoluto por 3 min.

Dos baños de Xilol /alcohol 1:1 por 3 min.

Montar

### **Anexo III**

#### **Amortiguador de digestión**

100 mM NaCl

10 mM Tris. Cl pH 8

25 mM EDTA pH 8

0.5 % Dodecil Sulfato de Sodio

0.1 mg/ml Proteinasa K

Acetato de amonio

Disolver 385.4 g de Acetato de amonio en 150 ml de Agua

Aforar a 500 ml

#### **Amortiguador TE**

10 mM Tris. Cl pH 7.4

1 mM EDTA pH 8

#### **EDTA 0.5 M**

Disuelva 186.1 g Na<sub>2</sub> EDTA. 2H<sub>2</sub>O en 700 ml de H<sub>2</sub>O

Ajustar el pH a 8 con 10 mM de NaOH

Aforar hasta un litro

1M Tris.Cl (Disuelva 121 g base Tris en 800 ml H<sub>2</sub>O)

Ajustar el pH deseado con HCl concentrado aforar hasta un litro)



## **LM-PCR**

### **Rampa**

55°C 15 min.

45°C 15 min.

35°C 15 min.

25°C 15 min.

10°C 10 min.

### **Amplificación**

72 °C 8 min.

**Correr 20-35 ciclos**

94 °C 1 mín.

72 °C 3 min.

72 °C 10 s

### **Finalizar con**

72 °C-15 min.

4 °C □infinito

### **Control Positivo**

Use 2.5 µl de control ADN Timo de Cordero en 70µl de mezcla de ligación y proceda con el protocolo normal realice 20-25 ciclos de PCR.

### **Control Negativo□**

Use 35 µl de Agua Grado PCR y 35µl de mezcla de ligación Seguir el protocolo normal realizando 20-25 ciclos.

### **Amortiguador para electroforesis TAE 50X 1 litro**

242 g Tris Base

57.1 ml Ácido acético glacial

37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O

Aforar a un litro

pH 8.5

## **Gel de Agarosa 2 %**

Agregar 1.6 gramos de agarosa en 80 ml de amortiguador TAE 1X en un matraz de 200 ml.

Calentar por 1 min. En horno de microondas.

Esperar a que enfríe un poco y agregar 1  $\mu$ l de Bromuro de etidio.

Verter a la cámara de electroforesis, dejar gelificar por 30 min.

**Muestras para correr en el gel**

Tomar 20  $\mu$ l de ADN amplificado y mezclar con 1.5  $\mu$ l de Amortiguador 6 X en un tubo ependorf de 0.5 ml.

Utilizar control de peso molecular de 100 pb

## **Amortiguador 6 X**

0.3% Azul de Bromofenol

0.3% Xilen Cianol FF

10 mM EDTA

97.5% Formamida desionizada

## **Anexo IV**

### **3-aminopropiltrietoxisilano SILANO**

Es una sustancia que permite la adhesión del tejido al portaobjetos y resista el trato que se le da a lo largo de la técnica.

Solución de Silano 2% en Acetona 100%

Colocar las laminillas en un vaso de Koplíng por 3 min.

Enjuagar 2 veces con agua destilada por 5 min.

Colocar en rejilla de metal para secar a temperatura ambiente o en la estufa a 37 °C

### **Irradiación de Microondas con Amortiguador de citratos**

Amortiguador de Citratos 10 mM pH 6

Ácido 0.1M de Ácido Cítrico

Base 0.1 M de Citrato de Sodio

Solución de trabajo 9 ml de Ácido + 41 ml de Base Llevar a 500 ml con agua desionizada.

### **Proteinasa K**

Disolver 20 µg/ml en 10 mM Tris/HCl pH 7.4

### **Solución de Permeabilización**

Mezclar 0.1% de Triton X-100 en 0.1% Citrato de Sodio

### **Mezcla de TUNEL para una laminilla**

3 µl de Solución enzimática

27 µl de Solución de Marcaje

### **Control Positivo**

Tejido incubado con Dnasa I (12.5 µl de Dnasa + 5 µl  $Cl_2Mg$  25 mM + 32.5 Amortiguador 1XPCR)

### **Control Negativo**

Se agrega solución de marcaje sin transferasa terminal enjuagar 2 veces con PBS

## **Anexo V**

### **Microscopia Electrónica**

#### **Preparación de fijador para microscopia electrónica**

Se agregan 10 ml de Glutaraldehido al 25% por cada 100 ml de Paraformaldehido al 4% en PBS 0.01M pH 7.2

#### **Deshidratación**

Alcohol 70% 10 min.

Alcohol 80% 10 min.

Alcohol 90% 10 min.

Dos cambios de Alcohol 100% 10 min. cada uno

Dos cambios de Acetona 100% 10 min. cada uno

Las muestras se preincluyen en una solución 1:1 de resina epoxica y acetona 100% por toda la noche a 4°C

### **Preparación de resina hidrofóbica EPON**

Epon 812 (Polimero) 4.3 ml Ether Glicídico 100  
DAS (Endurecedor) 4.3 ml Dodecenilsuccinico Anhidro  
NMA (Plastificador) 1.96 ml Metilnorboneno-2,3dicarboxilico anhidro  
DMP (Catalizador) 0.33 ml Dimetilaminometil fenol

### **Preparación de Azul de toluidina**

Azul de Toluidina 1 gr  
Tetraborato de Sodio 1 gr  
Agua destilada 100 ml

### **Preparación de Contrastantes**

#### **Citrato de plomo**

Hervir agua destilada y esperar a que alcance temperatura ambiente  
Agregar 0.3 g de Citrato de plomo en 10 ml  
Disolver en agitador magnético  
Adicionar gota a gota NaOH 10 N hasta llegar a pH 12  
Agregar un poco de aceite mineral  
Centrifugar 15 minutos a 300 rpm

#### **Acetato de Uranilo**

Hervir agua destilada y esperar a que alcance temperatura ambiente  
Agregar 0.3 g en 10 ml de agua destilada hervida  
Disolver en agitador magnético  
Agregar NaOH 10 N hasta alcanzar pH 4.5

## **Bibliografía**

Abbas, A. Lichtman, A. Pober, J.(2002). Inmunología celular y molecular. Mc. Graw Hill Interamericana Madrid.

Adams, D. R.(1998). Enfermedades vasculares cerebrales en Principios de Neurología Mc. Graw Hill Interamericana USA p.p. 674-685

Alonso, M. y E. Díez.(1998). Fisiopatología de la isquemia vertebrobasilar Rev Neurol 26 (149): 106-113

Alonso, M. y E. Díez. Fisiopatología de la isquemia cerebral. En: Jose Castillo Eduardo Martinez (1995). Trombosis, Fármacos Antitromboticos y Enfermedad Cerebrovascular. J. Uriach & Cia., S.A. p.p. 413-425.

Allsopp, T. Sean, W. Hugh, P. Alun, D. (1993). The proto-oncogen bcl-2 Can Selectively Rescue Neurotrophic Factor-Dependent Neurons from Apoptosis Cell 73 : 295-307.

Arends, M. J., Morris, R. G. Y Wyllie, A. H. (1992). Apoptosis: the rol of the endonuclease American Jurnal of Pathology 136: 593-608

Astrup, J, Siesjö B K, Symon L.(1981). Thresholds in cerebral ischemia: The ischemic penumbra. Stroke, 12: 723-725

Brown, A. Brierley, B. (1972) Anoxic-Ischemic cell change in rat brain light microscopic and fine-structural observations. J. Neurol. Sci. 16: 59-84

Buke TM, Snadstrom PA. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol Today 15: 7-10.

Castillo J. (1995). Intervenciones diagnosticas y terapéuticas en las primeras seis horas de la isquemia cerebral. Tiempos de latencia. Intervención prehospitalaria. *Neurología* 10: 1-7

Castillo, J. (2000). Fisiopatología de la isquémica cerebral. *Rev Neurol* 30 5: 459-464.

Charlotte. A, Klas. G, Galiana. S.(1999). Breakthroughs and views p53-induced Apoptosis as a Safeguard against Cancer *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265: 1-6

Diez-Tejedor E, Frank A.(1993). Tratamiento de la isquemia cerebral *Farmacoterapia*, 10:62-69

Du, C. Hu, R. Csernansky, C. A. Hsu, Cy. Choj, D.W.(1996) Very delayed infraction after mild focal cerebral ischemia a role for apoptosis? *J. Cereb Blood flow Metab.* 16: 195-201

Duke RC, Ojcius DM y Young DE (1996). Cell suicide in health and disease *Sci. Amer.* 52: 48-55.

Fortuna, S. Pestalozza, S. Lorenzini, P. Bisso, G. Morelli, L. (1997). Transient global brain hypoxia-ischemia in adult rats: neuronal damage, glial proliferation, and alterations in inositol phospholipid hydrolysis *Neurochem. Int.* 4 31: 563-569

García J H (1992). The evolution of brain infarcts. A review. *J Neuropathology Experimental Neurology* 51:387-393

Geddes. J, Credd. P, Holtz. M, Craddock. S, Maines. M, (1996). Permanent focal and transient global cerebral ischemia increase glial and neuronal expression of

heme oxygenase-1, but not heme oxygenase-2, Protein in rat brain Neuroscience letters 210 205-208

Ginsberg MD, Pulsinelli WA, (1994). The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. Ann Neurol 36: 553-554

Golstein P, Ojcius DM y Young DE (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity Annual Review of immunology 10: 267-293.

Hakim A. M. (1987). The cerebral ischemic penumbra. Cancer Journal Neurological. Science 14: 557-559

Hatashita S, Hoff OT, (1990). Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. Stroke 21: 582-588

Hayashi. T, Sakurai. M, Abe. K, Itoyama. Y, (1999). DNA fragmentation precedes aberrant expression of cell cycle-related protein in rat brain after MCA Occlusion. Neurol. Res. 21 7: 695-698

Heiss W D (1983). Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue. Stroke 14: 329-331

Iwai, T, Hara, A, Niwa, M, Nozaki, T, Uematsu, N, Sakai, H, Yamada. (1995) temporal profile of nuclear DNA fragmentation in situ in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia, Brain Res. 671: 305-308

Jun C, Kunlin J, Minzhi C, Wei P, Kenji K, David A, Roger P (1997). Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. J. of Neurochem. 1 69: 232-245

Jun, C. Tetsuya, N. Kunlin, J. Anne, S. Raymond, L. Steven, H. Roger, P. (1998). Induction of Caspase-3 like Protease May Mediated Delayed Neuronal Death In the Hippocampus After Transient Cerebral Ischemia. *J. of Neurosci.* 18 13 : 4914-4928

Kerr JFR y Harmon BV (1991) Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective, *Apoptosis: the molecular basis of cell death* Cold Spring Harbour Laboratory Press 3: 5-29

Kerr JFR, Wyllie AH y Curie AR (1972) Apoptosis a basic biological phenomenon whit wide-ranging implications in tissue kinetics *Br. J. Cancer* 26: 239.

Kumar S, Lavin MF. (1996). The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* 3: 255-267

Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, Federoff HJ. (1995) Expression of Bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia *Stroke* 26: 1670-1674

Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. (1993) Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats *Stroke* 24: 2002-2008

MacMannus JP, Buchan AM, Hill IE. (1999) Global Ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19 5: 502-510

Meldrum. BS, Evans. MC, Swan. JH, Simon. RP. (1987) Protection against hypoxic/ischemic brain damage whit excitatory aminoacid antagonist. *Med. Biol.* 65: 153-157.



Murayama S, Bouldin TW, Susuki K. (1990). Selective sparing of Betz Cells in primary motor area in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Neuropathol* 80: 560-562

Namura N.(1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia *Journal of Neuroscience* 18: 3659-3668

Naveiro, J. Castillo, J. Suárez, P. Aldrey, JM. Lema, M. Noya, M. (1998) Tiempo para el daño cerebral por hiperglucemia en la isquemia aguda. *Rev Neurol* 26: 790-793

Nedergaard M. (1996) Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage *Advanced Neurology* 71: 75-84

Niwa, M, Hara: A, Iwai, T, Nakashima, M, Yano, H, Yoshimi, N, Mori, H, Uematsu, T.(1995) Relationship between magnitude of hypothermia during ischemia and preventive effect against post- ischemic DNA fragmentation in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* 794: 338-342.

Pacher, A.(1998) Aspectos de la apoptosis *Medicina on line* 1 abril: 1-12

Papas, S. Crepe, V. Hasboun, I, Jororera, P. Chinestra, Y. Ben-Ari. (1992) Cycloheximide reduces the effects of anoxic insult *In vivo* and *In vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 4:758-765

Peitsch, M. Hans, G. Jürg, T. (1994) The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol.* 4: 37-41

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death *Nature* 356: 397-400

Rosenthal. M, Patricia. L, Thomás's. Miguel. P, (1997) Mitochondrial hyperperoxidation after cerebral anoxia/ischemia Epiphenomenon or precursor to residual damage? in Oxygen Transport to Tissue XIX 27 189-195

Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S, (1999) Apoptosis: Cell death defined by caspase activation. Cell Death & Differentiation 6: 495-496

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. Eur J Biochem 254: 439-459

Schulz JB, Weller M, Mąskowitz MA (1999) Caspses as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. Annals of Neurology 45: 421-429

Shigeno, T. Yamáshi, Y. Kato, G. Kusuka, K. Mima, T. Takakur, K. Graham, D. Furukawa, S. (1990) Reduction of delated neuronal death by inhibition of protein synthesis. Neurosci. Lett. 120 :117-119.

Siesjö B K (1988) Mechanism of ischemic brain damage Critical Care Medical 16: 954-963

Stanislaw, K. M. Krajewaska, L. Ellerby, K. Welsh, Z. Xie, Q. Deveraux, G. Slavesen, D. Bredesen, R. Rosenthal, G. Fiskum, and J. Reed (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia Proc- Natl- Sci 96: 5752-5757

Sweeney M. I., Yager I, Y. Walz W., Juurlink B, H, J.(1995) Cellular mechanisms involved in brain Ischemia. Can J Physiology Pharmacology, 73: 1525-1535

Tartosa, A. Rivera, R. Ferrer, I. (1994) Dose-related effects of cycloheximide on delated neuronal death in the gerbil hippocampus after bilateral transitory forebrain ischemia. J. Neurosci. 121: 10-17

Ulrika V. M. (1994) Advanced laboratory methods in histology and pathology  
Armed Forces Institute of Pathology Washington, D.C. 254 p.p.

Vaux DL (1993) Toward understanding of the molecular mechanism of  
physiological cell death Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 786-789

Weil M, Jacobson MD, Coles HSR, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC  
(1996) Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. J. Cell  
Biol. 133: 1053-1059

World Health Organization (2002) Leading causes of mortality and burden of  
disease, estimates for 2001. Disease statistics. World Health Organization.

Wyllie AH (1980) Glucocorticoid – induced thymocyte apoptosis is associated with  
endogenous endonuclease activation Nature 284: 555-556

Yi, L. Chopp, M. Powers. C, Jiang, N. (1997) Apoptosis and expression after focal  
cerebral ischemia in rat. Brain Research 765 301-312

Yuan, J. Shaham, S. Ledoux S, Ellis H.M. and Horvits, H.R. (1993) The C.  
elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-  
1 $\beta$ -converting enzyme. Cell 75:641-652

Zea, L. E. y P.Weinstein, S. Carlson, R. Cummins.(1989) Reversible Middle  
Cerebral Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats Stroke 20 1: 84-91

Zhang. W, Smith. C, Howlett. C, Stanimirovic, (2000) Inflammatory Activation of  
Human Brain Endothelial Cells by Hypoxic Astrocytes In Vitro Is Mediated by IL-  
1 $\beta$  J. Cerebral Blood Flow and Metabolism 20: 967-978.