

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES CELULARES PRODUCIDAS EN
CUERPO ESTRIADO E HIPOCAMPO POR ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL EN UN MODELO DE
RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA: ERIK CHÁVEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALMA ORTIZ PLATA

INVESTIGADORA EN CIENCIAS MÉDICAS "D"

ASESORA INTERNA: M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMIREZ



MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2008



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.

DEDICATORIA

A mi padre, Constantino Chávez Olgúin, por su confianza y comprensión en todos y cada uno de los momentos de mi vida

A mis hermanos; Hilda, Noemi y Oscar así como a mis cuñados Martín, Rubén y Nancy por todo el amor y cariño que me han brindado a lo largo de mi vida y carrera académica, les estaré eternamente agradecido por ayudarme a alcanzar una de mis mas grandes metas en la vida.

A mis sobrinos; Edwin, Nayeli, Andrea, Montserrat, Jennifer, Estephany y Grisel por los momentos felices y agradables que a su lado e pasado, fueron mi aliento para formarme como profesionista y poder así ser un ejemplo para ellos.

A mi madre Margarita y a mi hermano Víctor que se que siempre están al pendiente de mi. desde el cielo.

A ti amor, Saraí Juárez Castillo por tu cariño, comprensión e incondicional apoyo.

A Dios por darme vida y despertar siempre con una ilusión y una esperanza.

AGRADECIMIENTOS

- Al comité de becas de los laboratorios Armstrong por otorgarme la beca de pregrado y así poder llevar acabo a buen término la elaboración de mi tesis.
- Al Instituto Nacional De Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, por abrirme sus puertas y poder llevar acabo mi tesis.
- A mi directora de tesis, la Dra. Alma Ortiz Plata, Investigadora en Ciencias Médicas “D”, por obsequiarme su amistad y ser un soporte académico y moral.
- Al Dr. Daniel Rembao Bojórquez, jefe del departamento de neuropatología, por su apoyo y amistad brindada a lo largo de mi estancia en el Instituto de Neuropatología y Neurocirugía.
- A la Dra. Martha Lilia Tena Suck, por sus aportaciones a esta tesis.
- A la bióloga, Francisca Fernández Valverde, que siempre estuvo presente para ayudarme a resolver tantas dudas y enriquecer con su aporte académico este trabajo.
- A mis sinodales, M en IBSH. Angélica Flores Ramírez, M. en C. Marisela Valdez Ruiz, Biol. Maria Eugenia Ibarra Hernández y al Biol. Carlos Martínez Montoya. Sus aportaciones enriquecieron y mejoraron esta tesis.
- Al biólogo Jairo Martínez Mondragón, por su amistad y compañerismo a lo largo de este proyecto.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por permitirme acceder a una excelente formación profesional.

ÍNDICE

I Resumen	1
II Marco Teórico	2
2.1 Fases del evento Isquémico.....	5
2.2 Cadena de reacción que conduce a la muerte celular.....	7
2.3 Daño celular por Isquemia.....	8
2.4 Aspectos fisiopatológicos de la Isquemia.....	9
2.5 Estudios previos de la Isquemia.....	10
2.6 Neuropatología de la Isquemia cerebral.....	13
2.7 Tratamiento de la Isquemia.....	14
2.8 Estrategias neuroprotectoras.....	15
2.9 Daño celular mediado por acidosis y efectos moleculares del nivel energético.....	16
2.10 Daño Celular mediado por calcio.....	17
2.11 Daño celular por radicales libres.....	19
2.12 Necrosis.....	20
2.13 Apoptosis.....	21
2.14 Diferencias entre apoptosis y Necrosis.....	25
2.15 Caspasas ejecutoras de la muerte celular por apoptosis.....	27
2.16 Caspasa 3 y 9.....	28
2.17 Estrés oxidativo.....	29
2.18 VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).....	30
2.19 Aquaporina	31
III Justificación	32
IV Objetivos	33
4.1 Objetivo general.....	33
4.2 Objetivos particulares.....	33

V Hipótesis	33
VI Material y Método	34
6.1 Procesamiento de material biológico.....	35
6.2 Tinción con Hematoxilina & Eosina (H&E).....	36
6.3 Técnica de TUNEL.....	36
6.4 Cortes por congelación.....	37
6.5 Inmunohistoquímica.....	38
6.6 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica.....	38
VII Resultados	40
7.1 Análisis histológico de las alteraciones celulares con la tinción de H&E.....	40
7.2 TUNEL	44
7.3 Caspasa 3	45
7.4 Caspasa 9.....	46
7.5 Aquaporina-4.....	47
7.6 VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).....	48
7.7 Análisis ultraestructural.....	49
7.8 Microscopía electrónica.....	53
VIII Discusión	57
IX Conclusiones	61
X Anexos	62
XI Bibliografía	69

RESUMEN

La enfermedad vascular cerebral constituye una de las primeras causas de discapacidad y mortalidad en el mundo, por tal motivo, se ha trabajado en identificar los mecanismos de daño celular isquémico. Se han reportado cambios histológicos sugestivos de apoptosis producidos en el hipocampo a los 12 min de isquemia cerebral focal. Teniendo esto como antecedente, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios producidos en la región del cuerpo estriado e hipocampo a los 15 min de isquemia cerebral focal sin reperfusion, en un modelo de rata. Para ello, se produjo isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo en ratas Wistar, por 15 min. El tejido cerebral fue fijado con paraformaldehído al 4%, se seccionaron las regiones del estriado e hipocampo y se procesaron para microscopía de luz incluyéndolas en parafina. Otro grupo de ratas fue fijado con paraformaldehído al 4% - glutaraldehído 1% en PBS y el tejido fue procesado para microscopía electrónica de transmisión. Cortes de 4 μm del material incluido en parafina, fueron teñidos con hematoxilina – eosina y observados por microscopía de luz. En otras secciones se realizó la técnica de inmunohistoquímica con los anticuerpos: aquaporina 4, VEGF, caspasa 3 y caspasa 9. Se evaluó el daño al DNA por la técnica de TUNEL.

Con la tinción de hematoxilina y eosina se observaron células con pérdida de volumen celular en ambas regiones cerebrales. La técnica de TUNEL mostró fragmentación del DNA en la región del estriado y en las células piramidales e interneuronas del hipocampo. Los anticuerpos caspasa 3, caspasa 9, Aquaporina 4 y VEGF mostraron mayor positividad en la región del estriado. Con microscopía electrónica se observaron células encogidas con núcleos deformados, dejando ver ligeras condensaciones de la cromatina. Estos cambios fueron más marcados en el cuerpo estriado a comparación del hipocampo, en el cual las interneuronas son las que muestran mas daño. Los cambios en el hipocampo confirman las alteraciones reportadas con anterioridad que fueron corroboradas con TUNEL y fragmentación del DNA. Con este estudio se observó que también el cuerpo estriado sufre alteraciones, desde los primeros minutos de la isquemia y que esta región es más sensible al proceso isquémico. Las alteraciones observadas posiblemente estén relacionadas con cambios de muerte celular apoptótica.

MARCO TEÓRICO

En México la enfermedad vascular cerebral, dentro de los cuales se incluye mayoritariamente el infarto cerebral, presenta la misma incidencia que en los países desarrollados (Alcaraz, 2004); en 1997 hubo más de 25,000 muertes. El evento vascular cerebral (EVC), es una de las causas de incapacidad severa y permanente, representando la mitad de todas las hospitalizaciones por enfermedad neurológica (Kylan, 2002).

El mecanismo por el cual se desarrolla el EVC se debe a la alteración del flujo sanguíneo, que puede ser causado por dos mecanismos: 1) cuando un vaso se ocluye con un émbolo o un trombo (EVC isquémico); y 2) cuando un vaso debilitado se rompe dando lugar a un derrame en el cerebro (EVC hemorrágico). La causa de ello son los aneurismas (dilatación y adelgazamiento del vaso) y malformaciones arteriovenosas. Hay dos tipos de hemorragias que son las hemorragias intracerebrales y las hemorragias subaracnoideas (Diez-Tejedor, Kylan, 2002).

En la trombosis cerebral un trombo se desarrolla sobre la pared misma de la arteria enferma de aterosclerosis. En la embolia cerebral un coágulo se origina de un trombo en otro lugar del sistema circulatorio, usualmente en el corazón o arterias mayores del tórax o cuello; una porción del trombo se desprende del trombo principal y circula por el torrente sanguíneo, hasta que se atora en un vaso de menor calibre (Puurunen, 2001).

Una malformación arteriovenosa (MAV), es un conjunto de vasos anormales de pared débil que también pueden romperse. (Puurunen, 2001).

El EVC isquémico, constituye el 80 % de todos los EVC's y el hemorrágico el 20 % de los casos (Alcaraz, 2004).

Un accidente isquémico transitorio (AIT), se refiere a un pequeño EVC que suele ser un aviso de que un EVC mayor ocurrirá, se produce por pequeñas obstrucciones autolimitadas de vasos arteriales cerebrales y se manifiesta por síntomas transitorios típicos de los EVC's. Si aparece un AIT, la persona deberá recibir atención médica inmediata para evitar que ocurra un EVC mayor.

La atención requerirá de estudios doppler carotideo, panangiografía cerebral, ecocardiograma y con base a los resultados se efectuará manejo médico o quirúrgico (Leciñana, 2001).

La obstrucción de un vaso sanguíneo cerebral ocasiona un gradiente de flujo de sangre en el territorio vascular afectado, que da lugar a una zona central severamente hipoperfundida (núcleo isquémico), en tanto que en la periferia se establece una isquemia menos pronunciada (penumbra isquémica). La región de penumbra isquémica, donde el flujo residual es inferior al flujo normal e insuficiente para el mantenimiento de la función celular, permanece viable debido a la eficacia de la circulación colateral. En el núcleo isquémico, con un flujo inferior al umbral del infarto, se produce una muerte celular aguda principalmente por necrosis (Astrup, 1981).

La presencia de la zona de penumbra en la isquemia aguda en animales y humanos se ha establecido por varios estudios de tomografía por emisión de positrones y de imágenes de resonancia magnética. En la penumbra la función neuronal eléctrica esta abolida, pero se conserva una actividad metabólica mínima que preserva su integridad estructural durante algún tiempo, hasta que la producción de ATP cae por debajo del 50% de los niveles normales. Se ha sugerido que la muerte en la zona de penumbra tiene características de apoptosis en lugar de necrosis (Hakim, 1987) (Fig. 1).

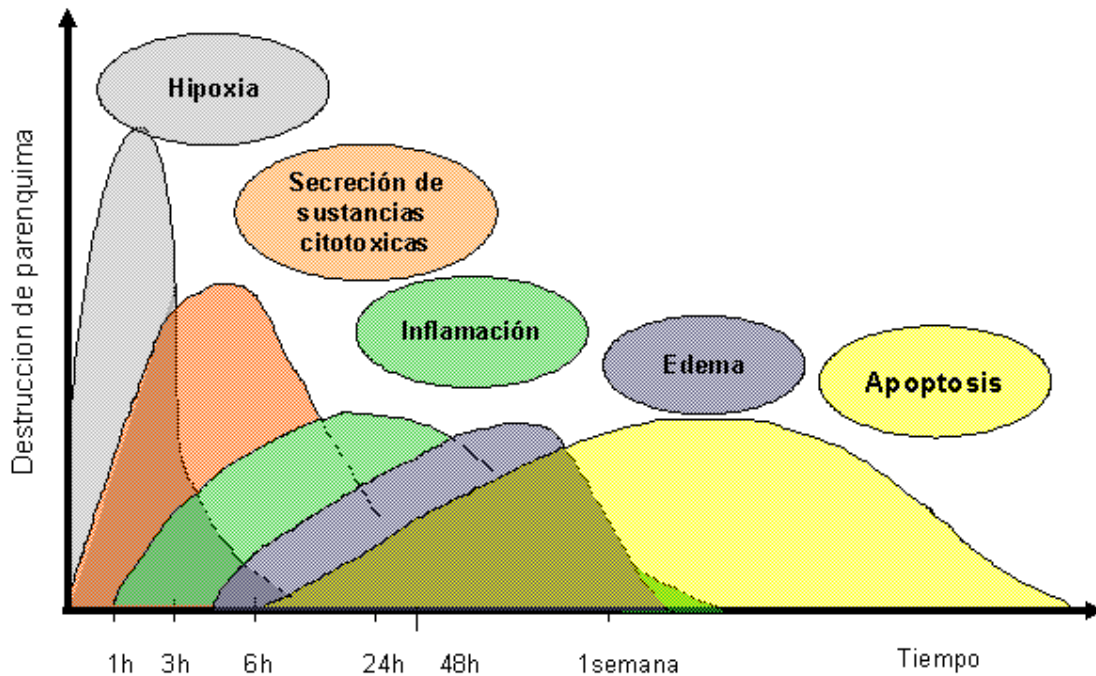


Fig.1 Evolución de los signos clínicos y patológicos de la isquemia cerebral en el tiempo (Hakim, 1987).

Lógicamente el periodo de tiempo durante el cual la penumbra persiste, representa una ventana potencial de oportunidad terapéutica (Nedergaard, 1996). La viabilidad de las células en la zona de penumbra tiene un tiempo limitado ya que la disminución de las reservas de oxígeno y glucosa desencadenan diversos procesos patológicos que pueden conducir a la muerte celular (Pacher, 1998). De manera que la zona de penumbra constituye el blanco principal para la mayoría de las intervenciones médicas agudas aplicadas entre las 3 y 6 horas post-isquémia (Hakim, 1987).

Sin embargo, no todas las neuronas responden de forma similar al daño isquémico; existe una vulnerabilidad selectiva relacionada con diferencias en los subtipos de receptores de membranas, diversas conexiones celulares, así como diferencias en la perfusión regional y en la exposición a factores de crecimiento (Pérez, 2005). Por ejemplo, las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo en la región CA1 y cerebelo, son más sensibles a la isquemia y sufren cambios estructurales más precozmente que las neuronas de otras localizaciones tales como, las células gliales (Hakim, 1987).

Por otro lado, las neuronas del tallo cerebral son más resistentes a cambios isquémicos y pueden sobrevivir hasta 24 horas antes de que ocurra la reperusión.

Fases del evento isquémico

En resumen el EVC se divide en dos fases:

1.- 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.- Fase tardía, en la región periférica a la zona de infarto (zona preinfarto) (Hacke, 1997), 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, 1995).

El área de penumbra se caracteriza por un flujo sanguíneo cerebral (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 disminución en la producción de energía, traducida en la pérdida de actividad eléctrica neuronal, se produce por debajo de 0.25ml/g/m, al igual que la acidosis tisular consecuencia del acúmulo de lactato; la pérdida de los gradientes iónicos transmembranales, que conduce a la despolarización y liberación de aminoácidos excitatorios como Glutamato y Aspartato y finalmente, la muerte celular tiene lugar cuando el flujo sanguíneo cerebral cae por debajo de 0.15ml/g/m (Sweeney, 1995).

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 aun sean viables, sin embargo, 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 por reperfusión, que tiene 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 de hipocampo varios días después de la normalización del FSC (Castillo, 1999).

Estos sucesos afectan a todas las estirpes celulares originando la pérdida de sus funciones. Las células gliales alteradas durante la isquemia contribuyen a la extensión de la lesión a través de la liberación de mediadores. En la pared arterial esto se materializa en ruptura de la barrera hematoencefálica y en 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. Estos fenómenos desencadenados de forma inmediata por la isquemia, ponen en marcha una cascada de reacciones que se autoperpetúan y, eventualmente, se potencian con la reperfusión dando lugar al daño por isquemia/reperfusión, término más adecuado ya que en la mayoría de los casos ambas van unidas y sus mediadores son comunes. Estos mediadores son la acidosis, la sobrecarga de calcio citosólico y la hiperproducción de radicales libres (Fig. 2).

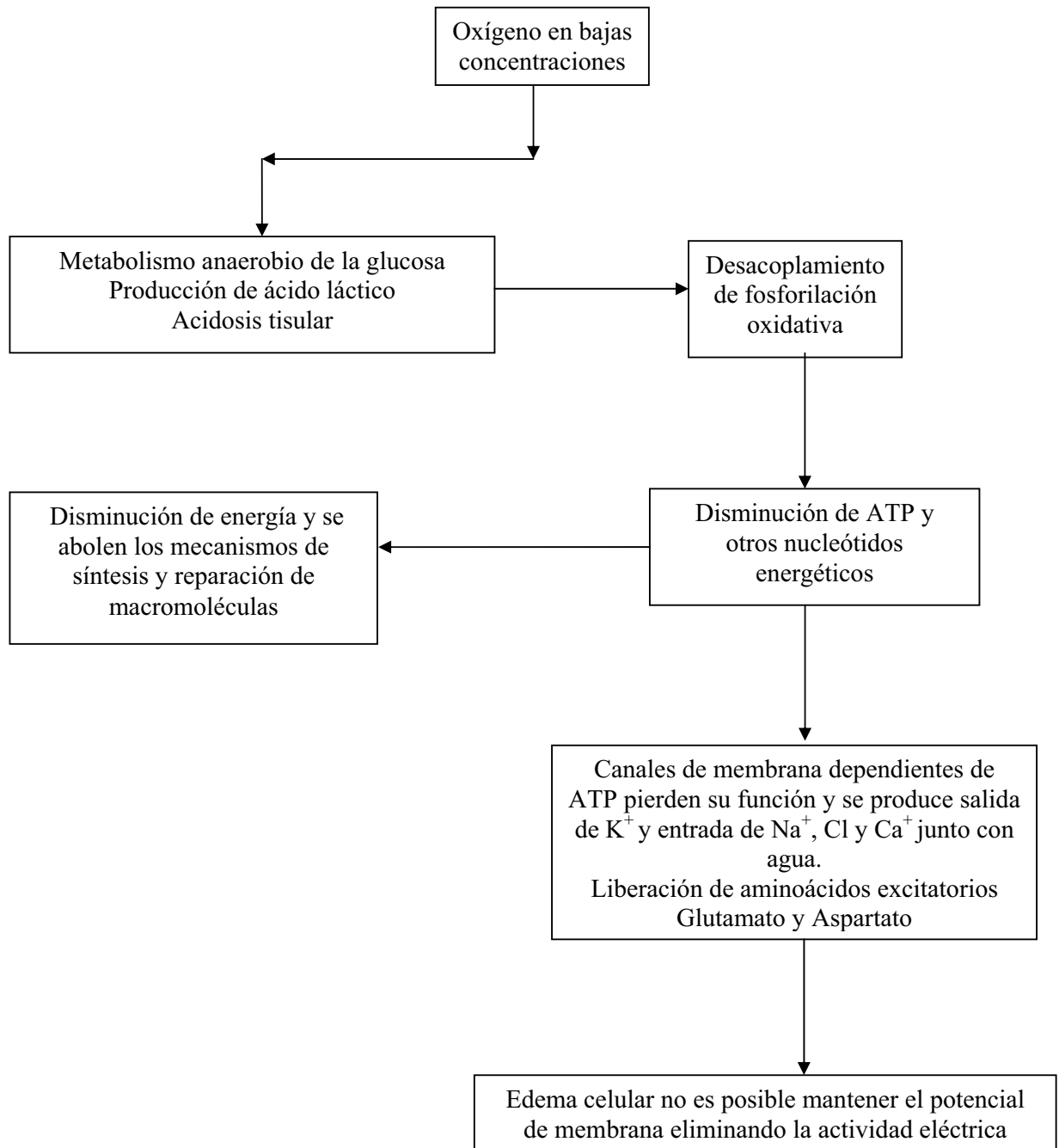
CADENA DE REACCIONES QUE CONDUCE A LA MUERTE CELULAR

Fig.2. Cadena de reacciones que conducen a la muerte celular provocado por isquemia (Sweeney, 1995).

Daño celular por isquemia

La disminución del flujo sanguíneo conduce a la aparición de alteraciones metabólicas y bioquímicas como ya se ha mencionado. La obstrucción de un vaso sanguíneo ocasiona un gradiente que da lugar a una isquemia intensa en el centro del territorio vascular y menor en la periferia (Arango-Davila, 2004).

La isquemia cerebral afecta predominantemente a la sustancia gris, en donde no todas las neuronas responden de igual manera al daño isquémico, ya que existe vulnerabilidad selectiva de acuerdo a la densidad neuronal, a la diferente perfusión regional y al metabolismo (Alcaraz, 2004).

En contraste con las alteraciones isquémicas de la función cerebral (alteración de la transmisión sináptica, despolarización de las membranas celulares y supresión de actividad electroencefalográfica) que aparecen inmediatamente después del comienzo de la oclusión vascular, el desarrollo de lesiones irreversibles apreciables morfológicamente, como la pérdida del volumen celular y la condensación de la cromatina, requiere algún tiempo (Alonso, 1998).

Otra alteración que aparece en el parénquima cerebral durante la isquemia es el edema, el cual consiste en la acumulación de líquido en el interior de las células (edema citotóxico) o en el intersticio vascular (edema cerebral vasogénico) el cual ocurre debido a la alteración de la barrera hematoencefálica. 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 (Charriaut-Mariange, 1998). La alteración de la permeabilidad celular es consecuencia de la falla energética, lo que ocasiona la interrupción del funcionamiento de las bombas de intercambio iónico lo que a su vez conduce al aumento de la osmolaridad y de la acumulación de productos de degradación, los cuales originan también un aumento de la permeabilidad de la membrana celular con incorporación de sodio y agua en el interior de las células. Estos cambios pueden ser reversibles si la duración de la isquemia no es prolongada o si no ocurre interrupción total del flujo sanguíneo. La reperfusión después de un periodo corto de isquemia normaliza la actividad metabólica celular y su volumen. Por el contrario, si la reperfusión se da después de 6 h de

isquemia, agrava el edema, ya que el aumento de presión hidrostática origina la aceleración de la extravasación de líquidos del comportamiento vascular (Noda-T, 1998).

Aspectos fisiopatológicos de la isquemia

El cerebro demanda gran cantidad de energía para mantener su integridad funcional, la cual proviene exclusivamente de la glucólisis aerobia y del transporte de oxígeno por lo que es particularmente vulnerable a cualquier alteración en el suministro del mismo. El tejido nervioso carece de reservas energéticas en forma de glucógeno y requiere un aporte constante de oxígeno y nutrientes transportados por medio de la sangre, para mantener sus funciones metabólicas.

Cuando se presenta la oclusión de alguna arteria cerebral por cualquier mecanismo o en una falla hemodinámica (alteración general de la circulación sanguínea), la reducción en el flujo sanguíneo da como resultado la disminución en el suministro de oxígeno y de los metabolitos de alta energía. La isquemia cerebral por tanto representa un desorden en la circulación sanguínea, que provoca tanto escasez de oxígeno y sustratos en el tejido, como la falla en la remoción de los productos metabólicos de desecho (Arango-Davila, 2004), produciendo de esta manera un daño neuronal.

El efecto lesivo de la isquemia cerebral acontece primariamente como resultado de la perturbación del metabolismo energético celular. La disminución del aporte de oxígeno condiciona el metabolismo anaerobio de la glucosa y consecuentemente un aumento de H⁺ (en relación directa con los niveles previos de glucemia), a la vez que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa origina un descenso en la producción de ATP y otros nucleótidos energéticos. La alteración funcional resultante se traduce principalmente en;

1.- Pérdida de la capacidad de los canales de membrana dependientes de ATP para mantener la homeostasis iónica, originando salida de K⁺ con el consiguiente aumento citosólico de Na⁺ y de agua, osmóticamente obligada, así como de Ca⁺. Inicialmente esto se traduce solo en imposibilidad para mantener el potencial de membrana y la actividad eléctrica neuronal normal.

2.- Abolición de los mecanismos de síntesis y reparación de macromoléculas esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de la célula.

3.- Aumento de los procesos de degradación

Todos estos sucesos afectan tanto a neuronas como a células gliales o de la pared vascular, especialmente a células endoteliales teniendo como resultado la pérdida de sus funciones. En la pared arterial esto se materializa en ruptura de la barrera hematoencefálica y en abolición de la reactividad vascular normal y, por tanto, de la capacidad de regulación de la circulación cerebral por cualquiera de sus mecanismos; físico-mecánico, metabólico humorales y neurógenos. Este fenómeno tiene gran importancia pues, contribuye a perpetuar los trastornos fisiopatológicos concretos (Rodríguez, 2002).

Estudios previos de la isquemia

El cerebro requiere del suministro constante de oxígeno y glucosa, la falla en el transporte de estos elementos genera una cadena de eventos que varían en relación al grado y duración de la interrupción o disminución del flujo sanguíneo, lo cual determinará si el cerebro sufrirá solo una disfunción temporal o un daño irreversible a unas cuantas neuronas o a un área extensa. Una isquemia cerebral focal suficiente como para provocar signos y síntomas y con una duración de solo 15 a 30 min. provoca daño irreversible a neuronas específicas, sumamente vulnerables. La evidencia clínica del daño cerebral permanente después de la isquemia puede ser o no detectable, dependiendo de la región y de la extensión de tejido cerebral involucrado (Bielawska, 1997).

La isquemia es un proceso muy estudiado en distintos órganos. Bielawska y col (1997) indujeron isquemia durante 30 minutos en corazón de rata seguida de una reperusión de 180 minutos, en éste caso la Ceramida (molécula resultante de la unión de un ácido graso de cadena larga por medio de un enlace amino a un Esfingolípido) aumentó en un 250% en el área isquémica, sus experimentos *in vivo* e *in vitro* demostraron por primera vez que la Ceramida está relacionada con la muerte por isquemia / reperusión en células de corazón.

En el caso del hígado Sasaki y col (1997) provocaron isquemia en dos grupos de ratas, uno de 30 minutos y otro de 60 minutos. En el grupo de 30 minutos la reperusión fue de 1 a 3 horas y de 3 a 6 horas en el grupo de 60 minutos buscando apoptosis. Los resultados mostraron que la apoptosis de los hepatocitos fue inducida durante las primeras etapas de reperusión después de la isquemia, esto sugiere que la apoptosis puede ser asociada con la isquemia y el daño por reperusión.

El intestino es otro órgano objeto de estudio para la isquemia. Noda (1998) formó dos grupos de ratas en los cuales se indujo isquemia durante 15 y 60 minutos respectivamente seguidos de reperusión. En este caso se pudo observar que el porcentaje de DNA fragmentado (característica de la apoptosis) aumentó significativamente justo después de la isquemia y tuvo un aumento repentino una hora después de la reperusión. Estos aumentos fueron significativamente altos en el grupo de 60 minutos comparado con el de 15 minutos.

En el caso del cerebro, por mucho tiempo se consideró que en la isquemia hipóxica la muerte celular era del tipo de necrosis, pero se ha observado que muchas neuronas sufren de apoptosis después de la isquemia (Alcaraz, 2004).

Charriaut (1998) demostró la presencia de ciertos signos característicos de la apoptosis.

- 1) El DNA se rompe en fragmentos con un patrón de escalera.
- 2) Condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos.
- 3) Activación de proteínas asociadas a apoptosis.

Estos resultados demuestran que la apoptosis contribuye al desarrollo del infarto isquémico.

Este tipo de isquemia es distinto al de isquemia excitotóxica la cual tiende a producir necrosis.

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 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 (Hacke, 1997).

El edema que aparece durante la isquemia cerebral es el resultado de la acumulación de líquido en el interior de las células, (edema citotóxico) del intersticio celular (edema vasogénico) o de ambos; dependen, del tipo, extensión, duración e intensidad de la isquemia cerebral (Castillo, 1999).

Las células de la glía 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 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. Estos factores son responsables de la progresión del edema y del

daño cerebral inicial, que en casos extremos, puede llegar a ocasionar una isquemia global y muerte cerebral (Castillo, 2004).

Neuropatología de la isquemia cerebral

El daño isquémico cerebral puede ser clasificado con base en criterios citopatológicos dentro de cuatro tipos. 1) La autólisis cerebral, observada más frecuentemente en cerebros de pacientes conectados a ventiladores mecánicos durante varios días, la cual refleja auto digestión enzimática del tejido. 2) El infarto cerebral, usualmente causado por una oclusión vascular focal, se caracteriza histopatológicamente por la necrosis de neuronas, glía y en algunas áreas células endoteliales. Los infartos cerebrales son discretos, frecuentemente se observan tejidos con apariencia pálida ó bien hemorrágica. Más frecuentemente, las áreas hemorrágicas descansan a lo largo de zonas de tejidos parcialmente profundidos y que inician generalmente con una oclusión embólica transitoria que continua con la reperfusión del lecho vascular infartado. 3) La suspensión momentánea de la circulación cerebral (isquemia global) durante algunos minutos provoca una necrosis isquémica selectiva de las neuronas más vulnerables. El tiempo requerido para que los cambios histológicos derivados de la isquemia alcancen su punto máximo, difiere marcadamente del curso temporal en la necrosis isquémica selectiva. En el transcurso de las primeras horas después del infarto ya pueden ser distinguidas a través de sencillas tinciones, las alteraciones histológicas que representan la muerte o supervivencia de neuronas y glía. En contraste, la necrosis isquémica selectiva de neuronas tiene una evolución más lenta y requiere de algunos días o más para alcanzar su pico máximo. 4) Otra lesión neuropatológica que puede distinguirse en la isquemia es la desmielinización de la sustancia blanca hemisférica central. Dicho daño es generalmente consecuencia, del envenenamiento por monóxido de carbono o debido a la hipoperfusión cerebral. En estas lesiones los axones aparecen desmielinizados y las células oligodendrogliales mueren (Adams, 1998).

Tratamiento de la isquemia

Actualmente, el tratamiento de la fase aguda de la isquemia cerebral comprende solamente medidas generales, ya que los tratamientos específicos todavía no están bien establecidos. Como primera pauta está la atención inmediata, controlando aspectos generales como las funciones respiratoria (tratamientos broncodilatadores) y hemodinámica (deshidratación, control de la tensión arterial, mantenimiento de la función cardíaca).

Para el tratamiento activo del edema cerebral se emplean diuréticos osmóticos como el manitol al 20%, aunque su uso está justificado solamente por trabajos y observaciones empíricas. De manera que en la mayoría de los casos el tratamiento depende de los síntomas generales del paciente (Alcaraz, 2004).

El período durante el cual los cambios isquémicos pueden ser reversibles constituye la ventana terapéutica (Kylan, 2002). Para los neurólogos una ventana terapéutica aceptable para un neuroprotector está entre 4 y 6 horas. Teniendo en cuenta la fisiopatología del golpe isquémico se pueden derivar tres posibles estrategias en el tratamiento orientadas a minimizar las consecuencias del accidente cerebrovascular isquémico: 1) incrementar las reservas energéticas de las células (tratamiento profiláctico exclusivamente); 2) minimizar el daño restableciendo la perfusión lo antes posible (terapias trombolíticas); y 3) neuroprotección propiamente dicha.

Se debe tener en cuenta también que si la isquemia es lo suficientemente prolongada, el tratamiento trombolítico no sólo no resulta efectivo, sino que exacerba el daño por reperfusión. Por último, la neuroprotección consiste en impedir o limitar farmacológicamente la progresión de la cascada isquémica en el área de penumbra, puesto que esta zona conserva una mínima actividad metabólica que preserva su integridad estructural durante algún tiempo (Arango-Davila, 2004; Fisher, 2004) (Fig. 3).

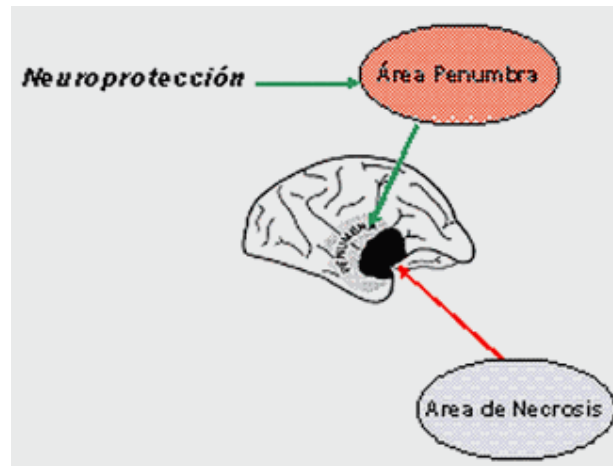


Fig. 3 Enfoque de la neuroprotección (Arango-Davila, 2004).

Estrategias neuroprotectoras

La neuroprotección es una estrategia de tratamiento terapéutico o también profiláctico, cuyo objetivo fundamental es prevenir u oponerse a la pérdida neuronal patológica que ocurre en enfermedades del sistema nervioso central de diferentes orígenes, como por ejemplo en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas (Corbett, 1998; Fisher, 1999; Margail, 2005).

Las técnicas modernas de imágenes han mostrado que el volumen del infarto se extiende durante varios días en los humanos (Sweeney, 1995). La lesión del cerebro inducida por la oclusión de la arteria cerebral media experimental también madura y crece en función del tiempo. El área de penumbra isquémica se caracteriza como una región con flujo sanguíneo cerebral reducido sin propiedades de excitabilidad eléctrica, pero donde no se perturban irreversiblemente los gradientes de iones (Pérez, 2005). De esta manera la penumbra isquémica ofrece una ventana de tiempo extendida para la terapia de neuroprotectores. La penumbra isquémica puede visualizarse con diferentes técnicas de imágenes y su recuperación o conversión al infarto se ha documentado en los modelos experimentales (Margail, 2005). Los estudios en animales indican que si el suministro de la sangre no se restaura y el tejido no es protegido metabólicamente en un periodo de 6 horas, la región de penumbra se

deteriora y contribuye al agrandamiento centrífugo del centro isquémico (Pérez, 2005). Se piensa por consiguiente que la terapia neurprotectora aguda también pudiera ayudar a los pacientes y que los neuroprotectores deben administrarse dentro de 6 horas (Corbett, 1998; Pérez, 2005).

Daño celular mediado por acidosis y efectos moleculares del nivel energético

Durante la isquemia, la reducción del flujo sanguíneo en el tejido cerebral, produce la disminución del ATP por la reducción de la fosforilación oxidativa. Esto se debe a que el tejido cerebral en ausencia de oxígeno, desvía su metabolismo energético hacia la glucólisis anaeróbica, vía que produce menos ATP y aumenta las concentraciones tisulares de ácido láctico (efecto pasteur). La isquemia junto con el incremento en la producción de lactato y con hidrólisis del ATP, aceleran la producción de protones. Abe (1996) observó que en las mitocondrias de las neuronas del CA1 del hipocampo, hay una disminución progresiva de la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa (COX-1), codificado en el ADN mitocondria (mtDNA), después de 3.5 min de isquemia transitoria y 3 horas de reperusión, desapareciendo completamente a los siete días.

La disminución de los potenciales de membrana debido a la caída de los niveles de ATP, produce la liberación de K y de aminoácidos excitatorios como el glutamato. Estos fenómenos agravan el proceso de disminución de ATP debido a los siguientes mecanismos:

- 1) Los mecanismos de transporte dependientes de sodio aumentan la velocidad de despolarización de la membrana al entrar exceso de sodio a la célula, aumentando así el consumo de ATP por la ATPasa Na – K; 2) Debido a la despolarización de los potenciales de membrana, los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) aumentan su sensibilidad a la acción activadora del glutamato al perder una molécula de Mg, lo cual produce la entrada masiva de Ca⁺, la activación de las bombas de calcio y la disminución de ATP; 3) La caída de los potenciales de membrana también agrava la disminución de ATP al activar los canales de calcio dependientes de voltaje (Guevara, 2004).

En resumen, sin ATP las células pierden la habilidad de mantener la homeostasis, además de no poder remover los productos de desecho.

En caso de que la acidosis sea suficientemente severa puede agravar la lesión isquémica por varios mecanismos:

1.- Aumentando el edema intracelular; Un aumento de H^+ puede ser intercambiado por Na^+ extracelular en un mecanismo de transporte acoplado al intercambio Cl/HCO_3 induciendo así, en un intento de regular el contenido en H^+ , la entrada de Na con agua osmóticamente obligada.

2.- Inhibiendo la fosforilación oxidativa.

3.- Alterando la microcirculación a través del daño a la célula endotelial por los mecanismos 1 y 2.

Daño celular mediado por calcio

El calcio es un modulador de la transmisión sináptica que es la base del procesamiento de información en el sistema nervioso central (Kamryn, 2007). Después de la isquemia hay liberación masiva de aminoácidos excitatorios que activan a los receptores NMDA y no NMDA, induciendo excitotoxicidad (degeneración neuronal mediada por la activación de los receptores del glutamato) y elevación intracelular de la concentración del Ca^+ por medio de diferentes vías como son los canales dependientes de voltaje, canales de calcio operados por receptores y movilización del calcio de los almacenes intracelulares, lo cual activa una serie de reacciones que llevan a la muerte celular (Storkebaum, 2004).

Para el buen funcionamiento de los procesos enzimáticos de la mayoría de las células, se requiere una concentración intracelular de calcio entre 50 y 300 nM, es decir, aproximadamente 4 veces menor que la del espacio extracelular. Durante la isquemia, la concentración intracelular de calcio aumenta, ya sea por difusión pasiva o por la activación de canales específicos de transporte. La concentración elevada de calcio intracelular activa y acelera la proteólisis dando como resultado la degradación de proteínas intracelulares, incluyendo aquellas que constituyen el

citoesqueleto (Guevara, 2004). Al exceder cierto límite, la concentración intracelular de calcio activa la proteasa Calpaina (cistein proteinasa dependiente de calcio), la que participa en la degradación neuronal hipóxica-isquémica al destruir proteínas del citoesqueleto; la proteína 2 asociada a los microtúbulos, la espectrina y la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) (Storkebaum, 2004).

Aunque el ión Ca^+ es fundamental para una gran cantidad de reacciones intracelulares, un aumento de sus niveles por encima de lo normal puede tener consecuencias nefastas. Ha quedado explicado como durante la isquemia cerebral ocurre un aumento severo de la concentración citoplásmica de calcio. Esto constituye un estímulo no fisiológico para la puesta en marcha de una serie de reacciones enzimáticas que, fuera de control, son altamente nocivas: proteasas que destruyen proteínas del citoesqueleto; endonucleasas que atacan ácidos nucleicos, proteincinasas, que produciendo su fosforilación alteran la función de receptores y canales iónicos; y, finalmente fosfolipasas, cuya activación tiene importantes consecuencias, además de producir la lesión estructural de membrana (Hacke, 1997).

Existe evidencia de que el aumento de calcio citosólico conduce a la estimulación de la sintetasa del óxido nítrico (NOS), una enzima dependiente de calmodulina, con el consiguiente acumulo de óxido nítrico (NO). El NO, que en condiciones normales es un mediador fisiológico de vasodilatación, así como inhibidores de la agregación plaquetaria, resulta muy tóxico cuando existe en grandes cantidades, pues conduce a la formación de radicales libres muy reactivos (Nedergaard, 1996).

La inhabilidad de la célula para regular el calcio intracelular da como resultado la muerte celular por necrosis. Por otra parte, otras consecuencias del aumento de calcio intracelular en la disminución de ATP son: 1) Activación de enzimas hidrolíticas dependientes de calcio, resultando en daño intracelular; 2) Activación de vías de segundos mensajeros que producen, entre otras cosas, cambios en la expresión genética y 3) Incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno que interfieren en la generación de ATP en la célula (Nedergaar, 1996).

Daño celular mediado por radicales libres.

Los radicales libres son sustancias que poseen átomos con electrones desapareados (Ej. O_2 , H_2O_2). En virtud de la gran reactividad que esto les confiere, tienden a originar reacciones en cadena, en las que se producen nuevos radicales libres que implican a componentes celulares (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) alterando su función normal. Estas sustancias existen de forma natural en las células normales con un papel fisiológico concreto, como puede ser la destrucción bacteriana en los fagocitos a cargo del ión superóxido (O_2^-) y del agua oxigenada (H_2O_2). El organismo dispone de mecanismos buffer enzimáticos (catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y NADPH) y no enzimáticos (vitamina E, C, carotenos, selenio) para neutralizar estas sustancias tóxicas naturales. Estos buffer's son insuficientes en condiciones que dan lugar a la producción de radicales libres en gran cantidad como la exposición a radiación ionizante, a infecciones, a determinadas toxinas y en la isquemia, sobre todo si se sigue de reperfusión. En estos casos los radicales libres son un importante mecanismo productor de daño tisular, siendo uno de los principales órganos diana la fracción lipídica de la membrana celular (Guevara, 2004).

Reacciones que dan lugar a la formación de radicales libres;

- El funcionamiento inadecuado del transporte de electrones acoplado a la fosforilación oxidativa favorece la formación de O_2^- y H_2O_2 en la mitocondria
- Por oxidación de aminas biógenas (noradrenalina, serotonina y dopamina) liberadas en exceso durante la isquemia
- El NO producido en grandes cantidades por activación enzimática, reacciona con O_2 , para formar peroxinitritos, que en solución ácida, reacciona con protones formando ácido peroxinitroso, que espontáneamente libera OH^- .

Los radicales libres desnaturalizan macromoléculas y característicamente producen reacciones en las que crean nuevos radicales libres que perpetúan el daño mediado por los mismos. Una de estas reacciones de gran importancia fisiopatológica es la peroxidación de lípidos de membrana. Los radicales libres actúan sobre ácidos grasos poliinsaturados presentes fundamentalmente en

fosfolípidos, para producir su peroxidación no enzimática; los radicales más reactivos, fundamentalmente OH, captan protones de los residuos de carbono del ácido graso dejando un electrón desapareado que puede reaccionar con oxígeno (fundamentalmente durante la reperfusión) para formar un radical peróxido, que a su vez es muy reactivo pudiendo llevar acabo la peroxidación de otros ácidos grasos. La peroxidación de los lípidos de membrana también es iniciada por acción enzimática (activación de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa). Los peróxidos lipídicos son muy tóxicos para componentes celulares por sí mismos o a través de su descomposición en aldehídos, que tienen lugar por acción del calor o de iones metálicos (Cu^+ y Fe^+) (Sabina, 2000).

El efecto final común de los tres mecanismos mediadores del daño celular por isquemia sería, por tanto, la destrucción de componentes funcionales y estructurales de la célula y el daño secundario a la microcirculación, que por diversos mecanismos (edema y lesión endotelial, formación de agregados celulares, alteración de la reactividad y permeabilidad vascular) ocasiona el denominado fenómeno de reflujo cerrando el círculo y perpetuando el proceso.

NECROSIS

El daño celular provocado por toda esta serie de procesos bioquímicos y metabólicos lleva a la muerte celular ya sea por necrosis o apoptosis.

La muerte celular por necrosis afecta a las células. En el centro del foco isquémico, se hinchan las células por lo que 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 membranal. Por último, los organelos se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular, permitiendo que el contenido citoplásmico 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 macromoleculares que constituyen a la célula (Sasaki-H, 1997).

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 (Charriaut-Mariange, 1998).

APOPTOSIS

La apoptosis es uno de los principales tipos de muerte celular programada (PCD). Como tal, es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, puede tener dos motivos fundamentales, como parte del desarrollo de estructuras corporales o bien para eliminar células que supongan una amenaza para la integridad del organismo. Se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrhexis), desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células (Bursch, 2002; Arends, 1992).

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos regulados genéticamente, que actúan de forma activa (pues consumen energía) y equilibrada. Como función necesaria para evitar la sobreproducción celular, se sospechaba de su existencia, pero es un proceso ordenado y "silencioso" que no produce reacción tisular y por ello difícil de detectar. En 1972 Kylan y col., estudiando organelos en células neoplásicas, detectaron que muchas células desaparecían en los cultivos, esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas y posteriormente mostraron mediante microscopía electrónica las alteraciones que

sufre la célula en un proceso que es de corta duración, durando en tales cultivos menos de una hora (Puurunen, 2001).

La apoptosis puede estar desactivada, en equilibrio o estimulada. Por ejemplo, está desactivada durante el desarrollo de espermatogonias, en las criptas de las glándulas intestinales (que es un epitelio de crecimiento rápido) y durante la lactancia en su período preparatorio, en que el tejido mamario aumenta su masa celular. Está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos. Es muy significativo su rol homeostático en la médula ósea, donde debe destruir de manera constante la mitad de una inmensa cantidad de células que sólo en leucocitos significa 5×10^{11} cada 24 h. Está estimulada cuando existen células envejecidas, mutadas, neoplásicas o no neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en proceso de metamorfosis (Zhu, 2004). Se ha estudiado esta condición en neutrófilos envejecidos, en megacariocitos con citoplasma agotado por producción excesiva de plaquetas, en la atresia folicular del ovario, en folículos pilosos en evolución y en la mama durante la involución post-lactancia (Puurunen, 2001).

El proceso de apoptosis puede ser iniciado por diferentes estímulos fisiológicos y patológicos, incluyendo la ausencia de factores de crecimiento, la exposición a agentes biológicos, químicos y el reconocimiento de modificaciones genéticas. Asimismo, cuando los genes que controlan el proceso apoptótico mutan, o se sobre expresan, la apoptosis origina diversas patologías. Se han identificado diferentes genes que participan en el proceso apoptótico, ya sea promoviendo o inhibiendo la apoptosis (Tabla 1).

PROMOTORES**INHIBIDORES**

P53	bcl-xl
Bcli-xs	bcl-w
Bax	mcl-1
Bak	ced-9
c-myc	E1 B 19 K
Bad	p53, IAP
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	

Tabla 1. Tipos de genes que controlan el proceso apoptótico (Pacher, 1998).

La protección que confiere la expresión del gen bcl-2 parece deberse a que su producto genético interfiere justo con los eventos de la fase de ejecución que lleva a la activación de caspasas adosadas en la membrana mitocondrial (Pacher, 1998).

En el proceso apoptótico se aprecian cambios morfológicos y bioquímicos característicos.

Desde el punto de vista morfológico se observan:

- El ADN del núcleo se condensa y se divide en fragmentos que se unen a la membrana nuclear.
- Pérdida del volumen citoplasmático,
- El retículo endoplásmico se dilata mientras que los otros organelos permanecen intactos.
- Se originan protuberancias en la superficie celular.
- Las célula se fragmenta en múltiples vesículas rodeadas de membrana celular, conteniendo componentes citoplasmáticos y nucleares (cuerpos apoptóticos).
- La membrana que rodea los restos celulares se mantiene intacta.
- Como no se libera el contenido celular el espacio intersticial no se produce reacción inflamatoria.
- Los cuerpos apoptóticos son rápidamente reconocidos como anormales y fagocitados por macrófagos tisulares y por células parenquimatosas vecinas.
- El proceso es muy rápido: en 2 a 5 minutos se produce la condensación de la cromatina y la fagocitosis se completa en alrededor de 2 horas (Mark, 2000).

Se han descrito tres fases en el proceso apoptótico: fase de inducción, fase efectora y fase de degradación. La primera se caracteriza por una heterogeneidad extrema de los patrones de transducción de las señales que llevarán a la muerte celular programada. Durante la fase efectora, los estímulos convergen en unos pocos patrones estereotipados y las células pasan a un “punto de no retorno”, desencadenando la “cascada de la apoptosis” y llegando en forma irreversible a la muerte. Hay evidencias de que las estructuras citoplasmáticas, incluidas las mitocondrias, participan en esta fase crítica y que las alteraciones nucleares son precedidas por alteraciones estructurales y funcionales de la mitocondria.

En la fase de degradación se observan los signos morfológicos característicos de la apoptosis; cromatolisis nuclear, retracción y fragmentación celular y fagocitosis sin respuesta inflamatoria.

La presencia de apoptosis en la etiopatogenia de numerosas afecciones, ha motivado a estudiar su empleo profiláctico y terapéutico mediante la modulación de la expresión genética, o con la utilización de inhibidores de factores de crecimiento y de favorecedores de la apoptosis. Entre los objetivos se encuentran las terapias antineoplásicas y el enfoque de patologías vasculares localizadas, así como el evitar las acciones colaterales perjudiciales de diversas monodrogas (Pacher, 1998).

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 (Tabla 2) (Pacher, 1998). 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. Durante la muerte por necrosis el ADN se degrada por acción de endonucleasas y exonucleasas, perdiendo su integridad, ya que al separarse en geles de agarosa se observa un barrido sin que aparezcan bandas. El barrido muestra que en la muerte por necrosis el ADN se corta en fragmentos de muy variados tamaños.

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 a 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 (Pacher, 1998).

	NECROSIS	APOPTOSIS
SITUACIONES	PATOLÓGICAS	FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS
BLANCO INICIAL	MEMBRANAS	ADN NUCLEAR
ETAPA INICIAL	EDEMA CELULAR	RETRACCIÓN CELULAR
ETAPAS POSTERIORES	ROTURA DE COMPONENTES LIBERACIÓN DE ENZIMAS LISOSÓMICAS, AUTOLISIS Y DAÑO TISULAR	FRAGMENTACIÓN EN VESÍCULAS RODEADAS DE MEMBRANA NORMAL
REACCIÓN INFLAMATORIA	SÍ	NO

Tabla 2. Cuadro comparativo entre necrosis y apoptosis, tipos de muerte celular (Pacher, 1998).

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 una muerte de células vecinas en las que no se hayan encendido los genes de muerte (Pacher, 1998).

La compartimentalización del contenido celular evita que los antígenos celulares puedan provocar una reacción auto inmune, característica que es la responsable de que no se produzca una respuesta inflamatoria durante la reabsorción tisular, aun 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).

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 (Zahoor, 2006).

La activación posterior de endonucleasas que tienen acceso a las regiones del ADN entre los nucleosomas hidrolizan al ADN; Su fragmentación se 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 solo 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 mas difícil de lo que originalmente se pensaba (Lum, 2005).

Caspasas ejecutoras de la muerte celular por apoptosis

Las caspasas son probablemente las moléculas efectoras más importantes de la apoptosis, pertenecen a la familia de las proteasas involucradas principalmente en la apoptosis. Se sintetizan como procaspasas. Son sintetizadas como precursores inactivos que son activados por escisión autocatalítica o por otras proteasas (Arends, 1992). Actúan sobre un gran número de sustratos, entre ellas las proteínas del citoesqueleto, proteínas relacionadas con el ciclo celular, con la escisión y reparación del ADN, con la transcripción y traducción de señales, en la activación de otras caspasas (efectoras) como iniciando los procesos que conducen a la degradación celular (indicadores). Todas las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato (Janicke, 2004).

No esta completamente comprendido cómo las caspasas contribuyen al proceso de muerte, 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 (Janicke, 2004).

Las caspasas contribuyen a la apoptosis a través del desensamble de la estructura celular, como lo ilustra la destrucción de la lamina nuclear, que es una estructura rígida que tapiza internamente la membrana nuclear y está implicada en la organización de la cromatina (Sabina, 2000). La lámina esta formada por polímeros de proteínas filamentosas intermedias. Durante la apoptosis dicha lamina se colapsa y la cromatina se condensa (Sasaki-H, 1997).

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 convergen para controlar la actividad de una proteasa efectora, llevan adelante la función de todo el proceso.

CASPASAS 3 Y 9

Son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos, también participan activamente en la cascada de eventos degenerativos en el infarto cerebral (isquemia). Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad.

La activación de la procaspasa-3 requiere una reacción escalonada: Primero Apaf-1 (factor de apoptosis proteasa-activadora-1) une ATP/dATP y los hidroliza a ADP y dADP respectivamente. Esta hidrólisis no tiene ninguna significancia funcional si el citocromo C (cyt c) está ausente; lo que parece ser que ocurre es que el ATP estabiliza la unión de cyt c con Apaf-1 y la hidrólisis de ATP/dATP induce la formación de complejos multiméricos de Apaf-1 y cyt c. Estos complejos multiméricos son totalmente funcionales para reclutar y activar a la procaspasa-9. Una vez que se ha formado ese complejo la procaspasa 9 es reclutada en proporción 1:1 a Apaf-1 y se activa por proteólisis, más exactamente por autocatalisis de la propia procaspasa-9 (Janicke 2004).

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 de 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 (Janicke, 2004). Por otra parte, las alteraciones que permiten la liberación de citocromo C afectan 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 si sólo puede conducir a la muerte celular (Bielawska-AE, 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 aumento en el metabolismo de ácido araquidónico que ha sido asociado a la muerte celular, posiblemente por la generación de radicales libres (Bielawska-AE, 1997).

En vista de que la apoptosis esta controlada por información genética, está sujeta 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 alteraciones 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, isquemia cerebral y episodios de isquemia-reperfusión.

VEGF

El Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una sustancia elaborada por células que estimulan el proceso de angiogenesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red vascular existente, la cual contempla una secuencia de eventos complejos y es fundamental en el proceso reparativo.

Existen múltiples factores estimulantes de la angiogenesis. Entre ellos podemos citar el crecimiento normal de los tejidos en el desarrollo embrionario, la reparación de las heridas y los cambios endometriales durante el ciclo menstrual. En el proceso de angiogenesis participan activamente las células endoteliales, ellas migran, proliferan y se ensamblan con firmeza para luego contener la sangre. Normalmente las células endoteliales maduras no se multiplican, constituyendo una población estable que se encuentra en fase G₀ del ciclo celular (o fase de reposo) (Storkebaum, 2004).

El efecto del VEGF esta mediado por tres receptores Tirosina-Cinasa, VEGFR-1 (Fit-1), VEGFR-2 (KDR-FIK-1) y VEGFR-3 (Fit-4) (Storkebaum, 2004). Estudios han demostrado que un anticuerpo específico anti-VEGF podría inhibir el crecimiento tumoral en modelos de animales, de esta manera comenzó el desarrollo de una versión humana del anticuerpo VEGF (Storkebaum, 2004).

AQUAPORINA

Las aquaporinas (AQP) son una clase de proteínas integrales de membrana en donde forman poros. Muchos tipos celulares humanos expresan estas proteínas como riñón, cerebro, ojo, epitelio glandular, endotelio, epidermis entre otros, así como ciertas bacterias y también algunas plantas en donde asumen un papel regulador en el sistema de transporte de agua (Hiroaki, 2006). Las aquaporinas conducen selectivamente las moléculas de agua dentro y fuera de la célula, al mismo tiempo previene la penetración a la célula de otros solutos; también son denominadas canales de agua, cuya presencia aumenta la permeabilidad de la membrana (Hiroaki, 2006). Se ha demostrado que las AQP son importantes en el mecanismo de la concentración de orina, en la secreción de fluidos glandulares, regulación de la presión intraocular e intracraneal, migración celular, edema cerebral, hidratación epidérmica, metabolismo de los adipositos y otras funciones. El papel que juegan las AQP en los organelos es menos claro. Estudios recientes han reportado la expresión de las AQP en la mitocondria, sugiriendo que tienen una posible participación en el metabolismo y en la apoptosis así como en la patogénesis de enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson (Hiroaki, 2006). Por estudios de la permeabilidad osmótica al agua se reportó la presencia de AQP-4 en mitocondrias del cerebro.

Defectos genéticos relacionados con los genes que codifican a las aquaporinas han sido asociados a varias enfermedades humanas (Hiroaki, 2006).

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cerebro-vasculares son de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. El infarto cerebral constituye la tercera causa más común de muerte en las ciudades industrializadas después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, e implica un alto impacto económico ya que los costos que se estiman son aproximadamente de 30 mil millones cada año, la mitad de lo que se atribuye para los costos médicos en general (Castillo, 2004).

En los últimos 20 años se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de comprender los mecanismos metabólicos y moleculares implicados en el daño cerebral isquémico, pero no se ha logrado llegar a un acuerdo entre las evidencias moleculares y los hallazgos histológicos, del daño celular producido por la isquemia cerebral.

Con el desarrollo de éste trabajo se pretende aportar un conocimiento más amplio sobre las alteraciones celulares que se inician en respuesta a una lesión isquémica, lo cual permitiría desarrollar estrategias terapéuticas que minimicen sus repercusiones.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Estudiar el daño celular que produce la isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo en un modelo de rata, en las regiones del cuerpo estriado e hipocampo.

Objetivos Particulares

- Reproducir el evento isquémico en un modelo de rata, por medio de la oclusión de la arteria cerebral media.
- Analizar los cambios histológicos producidos por isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo sin reperusión a los 15 minutos, en las regiones del estriado e hipocampo, por medio de la tinción general de hematoxilina y eosina.
- Detectar la presencia de proteínas implicadas en el daño celular aplicando la técnica de inmunohistoquímica.
- Estudiar el daño que ocurre en el ADN a los 15 minutos de isquemia cerebral focal, utilizando técnicas de marcaje celular y poder identificar la fragmentación del ADN utilizando la técnica de túnel.
- Evaluar las alteraciones ultraestructurales con ayuda de la microscopía electrónica de transmisión.
- Determinar en base a las evidencias moleculares e histológicas que región es más sensible al daño isquémico.

HIPÓTESIS

Si el tejido cerebral es muy sensible a las alteraciones del flujo sanguíneo y si la isquemia provoca alteraciones en sus componentes celulares desde los primeros minutos, entonces será posible observar, analizar y comparar el daño que es producido por este evento vascular a los 15 minutos de isquemia cerebral focal sin reperusión en el cuerpo estriado e hipocampo.

MATERIAL Y METODO

Inducción de la isquemia

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 280 - 300g de peso con una edad promedio de 4 meses, las cuales 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 monofilamento de calibre 3-0 a través de la arteria carótida interna hasta bloquear el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media (Zea Longa, 1989).

Se indujo isquemia cerebral focal por 15 minutos sin reperusión (restauración de flujo sanguíneo) y sacrificio al término del tiempo. Se emplearon otras ratas sin ninguna manipulación, como individuos control.

La rata fue anestesiada con Halotano (Fluotane Astra Zeneca) 2% con oxígeno (v/v) en una máquina Ohmeda Fluotec 3, y se colocó en posición decúbito dorsal. Bajo un microscopio quirúrgico (Olimpus 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 posicionándolos entre el músculo digástrico y el esternocleidonástoideo, se incidió en el músculo homioideo el cual fue dividido, exponiendo la arteria carótida común. Se disecó la arteria carótida común hasta el asa del hipogloso y se identificó la bifurcación carotidea, la carótida externa y sus ramas occipital y tiroidea las cuales fueron disecadas, electrocoaguladas y cortadas. La arteria carótida interna fue aislada cuidadosamente del nervio vago adyacente. Después se identificó el origen de la arteria pterigopalatina y se ligó justo en la bifurcación con hilo seda 6-0.

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 de sutura de seda de 6-0 alrededor de la arteria carótida externa, la cual fue anudada, electrocoagulada y cortada a la altura de la arteria tiroidea. Posteriormente se colocó un clip transitorio sobre la arteria carótida externa justo en la bifurcación con la arteria carotida interna para cerrar el FSC, y se realizó un pequeño corte en el fragmento de la arteria carotida externa a través del cual se introdujo un fragmento de dos centímetros de longitud de sutura de nylon de calibre 3-0 con punta redonda; un nudo suave fue colocado alrededor del nylon intraluminal para evitar el sangrado y el clip transitorio fue removido. La sutura de nylon se avanzó suavemente a través de la carótida interna, se continuó hasta que la sutura fue introducida totalmente para llegar a la arteria cerebral media, cerrando el flujo de sangre de ésta.

Los controles fueron ratas que se sacrificaron sin someterlas al procedimiento isquémico, es decir no hubo interrupción del flujo sanguíneo.

Procesamiento de material biológico

Después de 15 minutos de isquemia cerebral focal, y con la rata totalmente anestesiada, se procedió a la fijación.

El animal se perfundió vía intracardiaca haciendo pasar primero 200 ml de solución salina fisiológica isotónica de cloruro de sodio 0.9% (laboratorios pisa, Guadalajara Jal, México) y posteriormente paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M pH 7.4 a través de la vena cava. Posteriormente, se extrajo el cerebro, se colocó en fijador frío por una hora y se seccionaron las regiones a estudiar, cuerpo estriado e hipocampo, las cuales se mantuvieron en fijación por otras 18 horas a 4°C, transcurrido este tiempo se deshidrataron en alcoholes graduales, en un procesador automático de tejidos (Histokinette 2000, Reichert-Jung. American Optical), después fueron incluidos en bloques de parafina y se realizaron cortes de 4 µm de espesor con un micrótopo (Microm HM 320 made in Germany) (Anexo 1).

Tinción con Hematoxilina & Eosina (H&E)

El estudio microscópico con la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) nos permite valorar perspectivas panorámicas del tipo de tejido, patología y acompañantes morfológicos, (hemorragia, necrosis, inflamación, etc.) (Prophet, 1995).

Los cortes del tejido incluidos en parafina fueron desparafinados en Xilol, hidratados en alcoholes de concentración gradual descendente, teñidos con la técnica de Hematoxilina & Eosina (Ulrica, 1994) y montadas con resina Polimount (Polyscience). Las preparaciones fueron observadas bajo un microscopio óptico Olympus CH2 (Anexo II).

Técnica de TUNEL

La técnica de túnel recibe este nombre por su título en inglés: terminal deoxinucleotidil transferasa mediated dUTP Nick end labeling. Debido a que el ADN genómico sufre rompimiento durante la apoptosis, presentando fragmentos de alto y bajo peso molecular, estos fragmentos pueden ser identificados por medio del marcaje de los extremos 3'-OH Terminal libres con nucleótidos marcados mediante una reacción enzimática catalizada por la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, que polimeriza los nucleótidos en el extremo Terminal; al estar marcados con fluoresceína los polímeros pueden ser detectados por microscopía de fluorescencia. Este procedimiento fue realizado con el kit "In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein" (Boehringer Mannheim).

De las muestras de las diferentes regiones cerebrales ya incluidas en parafina, se obtuvieron cortes de 4 μm de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos pretratados con silano, (3-Aminopropyltriethoxy-silane Sigma Aldrich Chemical. Steinheim Germany) el cual es una sustancia que le permite al tejido tener mejor adherencia a la laminilla para este tipo de material. Se metieron a la estufa durante una hora aproximadamente y fueron desparafinadas e hidratadas. Los tejidos fueron sometidos a un proceso de recuperación para permitir el paso libre de los reactivos al núcleo celular, que consistió en sumergir las laminillas en amortiguador de citratos 10mM pH 6 en un vaso Koplring de polipropileno en baño

Maria, sometido a 10 minutos de calor en una olla de presión, cuidando que el amortiguador no se evapore. Las laminillas se dejaron enfriar en baño María por 5 minutos, se lavaron con PBS en dos ocasiones por tres minutos y se incubaron con Proteinasa K (20 μ /ml) por 15 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente, las laminillas se enjuagaron con PBS en dos cambios de 3 minutos. Por último, se aplicó la solución recuperadora por dos minutos 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 a las laminillas y fueron incubadas en oscuridad en una cámara húmeda por 60 minutos a 37°C los cortes nuevamente fueron enjuagados con PBS, se contratiñeron los núcleos con Yoduro de Propidio (1:60 en PBS) por 10 minutos y se enjuagaron dos veces con PBS y posteriormente se montaron con Vectashield un reactivo especial para fluorescencia (Vector laboratories INC, Burlingame CA, USA), y se le colocó un cubreobjetos que fue sellado 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 usó una laminilla que fue sometida a una digestión enzimática con Dnasa 1 durante 10 minutos en cámara húmeda (Anexo III).

Cortes por Congelación

De otro grupo de ratas experimentales con isquemia cerebral focal de 15 min (n=3) y del grupo control (n=3), se obtuvieron muestras para cortes por congelación. Se obtuvo el cerebro en fresco de cada individuo y sin fijar, se colocó sobre una caja de petri la cual estaba en hielo; se procedió a cortar las regiones cerebrales a estudiar (estriado e hipocampo) y se congelaron en isopentano (2-Metilbutano; PM: 72.2) (Sigma Aldrich Chemical. Steinheim Germany) previamente enfriado en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas a -70°C en un ultracongelador (Legaci Refrigeration System, Asheville, North Carolina, USA) para posteriormente ser cortadas en un microtomo de congelación (criostato) y montadas en laminillas pretratadas con poly L lysina que permiten buena adherencia a la laminilla en este tipo de cortes. Los cortes fueron almacenados en el ultracongelador hasta su uso. Este procedimiento se realizó para la inmunohistoquímica con la caspasa 9, debido a

que las especificaciones técnicas del anticuerpo señalan que solo funciona en material de congelación.

Inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos.

En este caso se utilizaron anticuerpos tales como; aquaporina 4 (dilución 1:50) (Biotechnology, Santa cruz, E.U); VEGF (dilución 1:50) (BioGenex. San Ramon CA. 94583 USA); caspasa 9 (BioGenex. San Ramon USA) y caspasa 3 (BioGenex. San Ramon CA. 94583 USA) con una dilución 1:100.

La detección de la reacción se realizó con un Kit de detección (Link-Label IHC Detection system. BioGenex. San Ramon CA. 94583, USA). Las laminillas fueron analizadas en un microscopio olimpus CH2 (Anexo IV).

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica

Las ratas control y las sometidas a isquemia cerebral focal fueron fijadas por perfusión intracardiaca con glutaraldehido (Merk Darmstadt Alemania) al 1% - Paraformaldehido (Merk Darmstadt Alemania) 4% en PBS. Se obtuvieron las regiones en estudio, fueron fijadas por inmersión durante una hora en el mismo fijador y se cortaron en fragmentos de 3 mm y se sumergieron en fijador una hora a 4° C, una vez transcurrido este tiempo se enjuagaron en PBS por 15 min. Posteriormente, manteniendo todo a 4°C (en hielo), se deshidrataron en alcoholes graduales y se realizó el procedimiento de preinclusión en una serie de mezclas de alcohol absoluto – resina LR-White (Electron Microscopy Sciences) en concentraciones ascendentes. Se dejaron en resina LR-White pura y por último se hicieron tres cambios de una hora. Se incluyeron en resina LR-White y se polimerizaron a 60° C.

Se obtuvieron cortes semifinos de 1µm de grosor, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y fueron observados bajo el microscopio óptico. Se obtuvieron cortes ultrafinos en el patrón gris-plata del espectro de los colores de interferencia (60 nm), fueron contrastados con metales pesados (Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo) dejando la rejilla con los tejidos en contacto directo con la gota del metal pesado, primero 10 min en Acetato de Uranilo, se enjuagó la rejilla con agua desionizada y después se dejó otros 5 min en Citrato de Plomo, por último una vez más se enjuagó la rejilla con agua desionizada y se depositó en una caja petri con papel filtro. Posteriormente fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM 10-A. Se tomaron micrografías electrónicas con una película de alto contraste (kodolith) la cual fue revelada y las fotos fueron positivadas en un papel kodabrome F2, (Anexo V).

RESULTADOS

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS ALTERACIONES CELULARES CON LA TINCIÓN DE H&E

Controles.

ESTRIADO: en los cortes teñidos con H&E se encontraron neuronas conservadas con núcleo prominente redondo de color azul, con nucléolo muy intenso así como citoplasma de tono rosado con límites de membranas nucleares y citoplásmicos bien definidos y regulares, los astrocitos también presentaron buena conservación (Fig. 1).

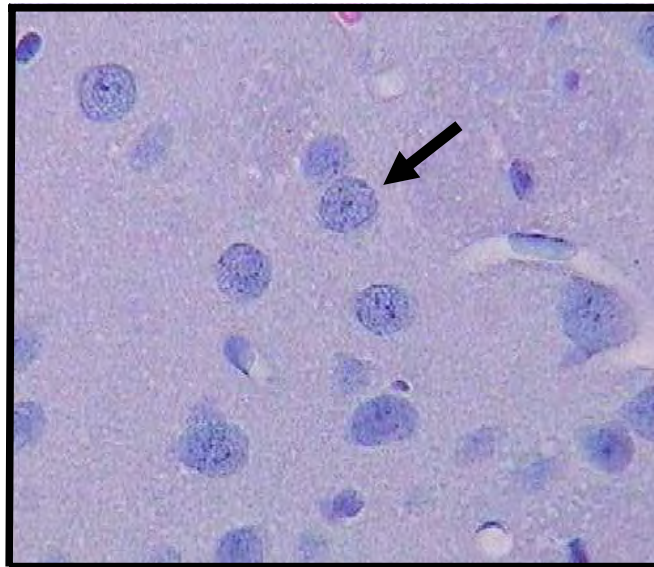


Fig. 1 Corte de cuerpo estriado de rata control teñido con H&E en el que se observan células (flecha) uniformes bien conservadas con núcleos bien definidos (400x).

HIPOCAMPO: las neuronas piramidales, así como las interneuronas mostraron buena conservación con núcleo y nucléolo muy bien definidos y un citoplasma bien delimitado (Fig. 2).

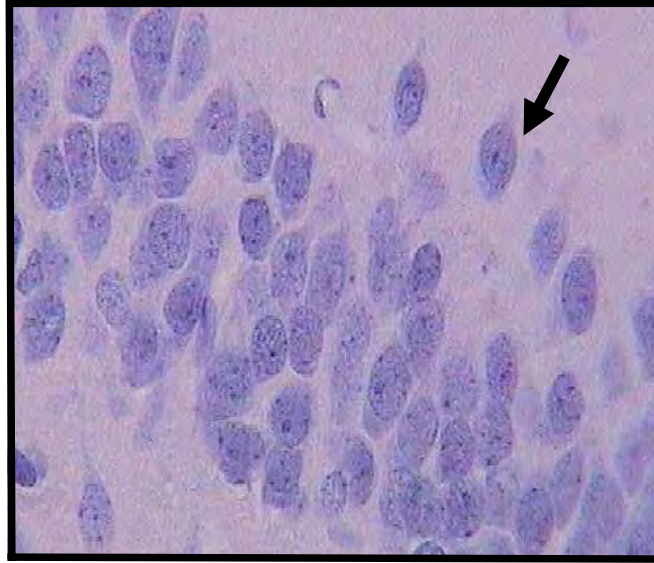


Fig. 2 Corte de hipocampo de rata control teñido con H&E, en el que se muestran neuronas piramidales e interneuronas (flecha) uniformes y bien delimitadas (400 x).

ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL DE 15min

ESTRIADO: se observaron células con pérdida de volumen celular, tinción intensa (picnosis) y ausencia de edema (Fig. 3).



Fig. 3. Corte de cuerpo estriado de rata con isquemia cerebral focal de 15 min teñido con H&E en el que se muestran células picnóticas (flecha) (400X).

HIPOCAMPO: se encontraron neuronas con las mismas características que en el estriado, células picnóticas sin edema; en esta región se observó más daño en las interneuronas en comparación con las células piramidales. Comparando las dos regiones estudiadas, cualitativamente se observó más daño en la región del estriado. (Fig. 4).

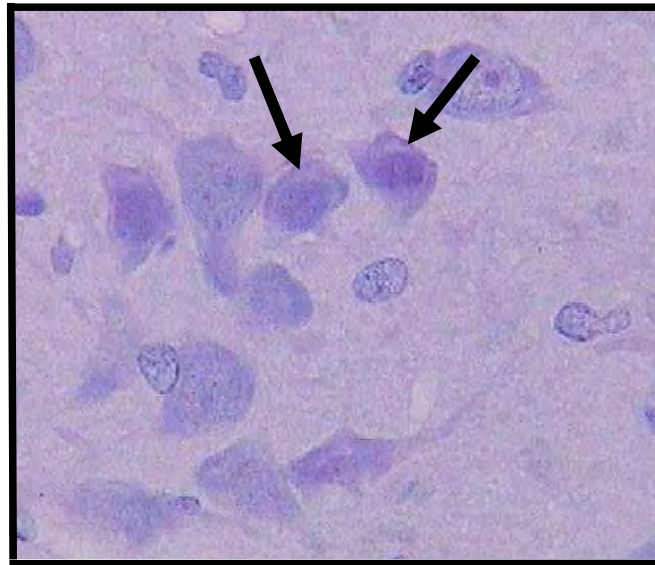


Fig. 4. Corte de hipocampo de rata con isquemia cerebral focal de 15 min teñido con H&E, en el que se muestran células piramidales con pérdida de volumen celular (flecha), amorfas y picnóticas, (400x).

TUNEL

ESTRIADO: con la técnica de TUNEL se pudieron observar núcleos marcados positivamente en toda la región del estriado, indicando la presencia de la fragmentación al DNA (Fig. 5).

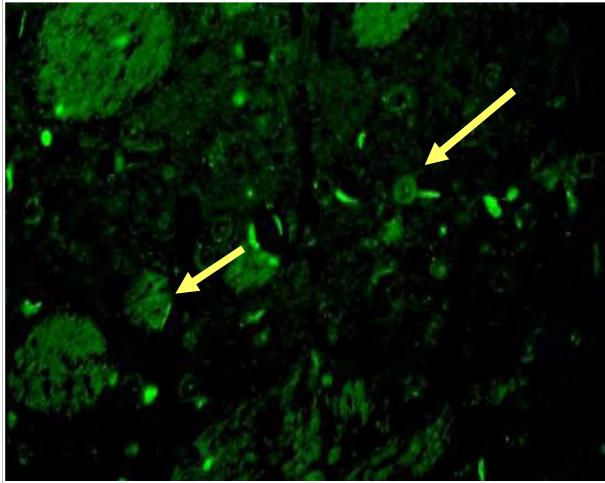


Fig. 5. Corte de la región de cuerpo estriado marcado con la técnica de TUNEL, en donde se observan neuronas con núcleos marcados positivamente (flechas; 400x).

HIPOCAMPO: en esta región también se encontraron núcleos marcados, en donde la positividad fue más clara en las interneuronas que en las células piramidales (Fig. 6).

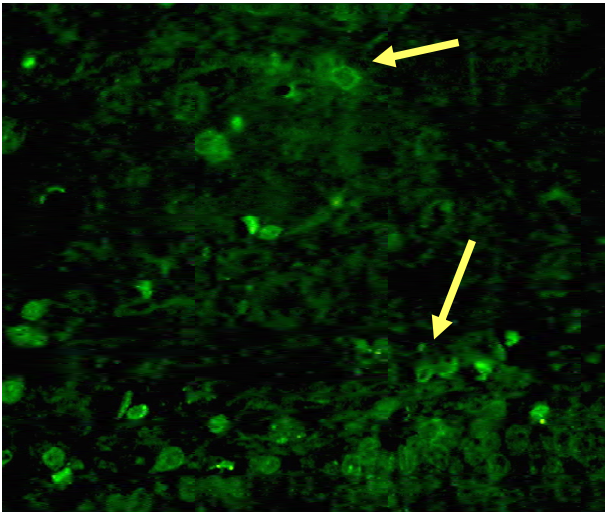


Fig. 6. Corte de la región del hipocampo teñido con la técnica de TUNEL, en donde se observa positividad de las interneuronas (flechas; 400x).

CASPASAS

CASPASA-3

ESTRIADO: con la técnica de Inmunohistoquímica con caspasa 3 en estriado, se observó positividad nuclear muy marcada (Fig. 7).

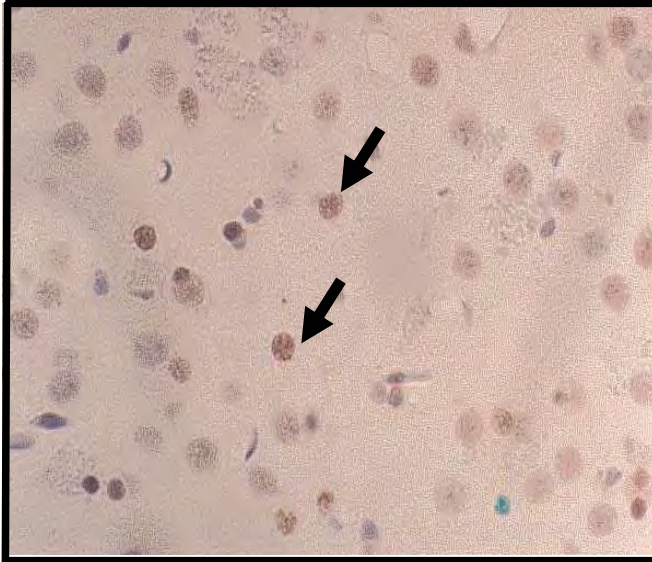


Fig. 7. Corte de cuerpo estriado de rata con isquemia cerebral focal de 15 min con la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo caspasa 3. Se muestran núcleos marcados (flecha) con positividad intensa (200x).

HIPOCAMPO: la positividad en esta zona fue también notable, pero menor que en estriado, intensificándose más dicha positividad en las interneuronas (Fig. 8).

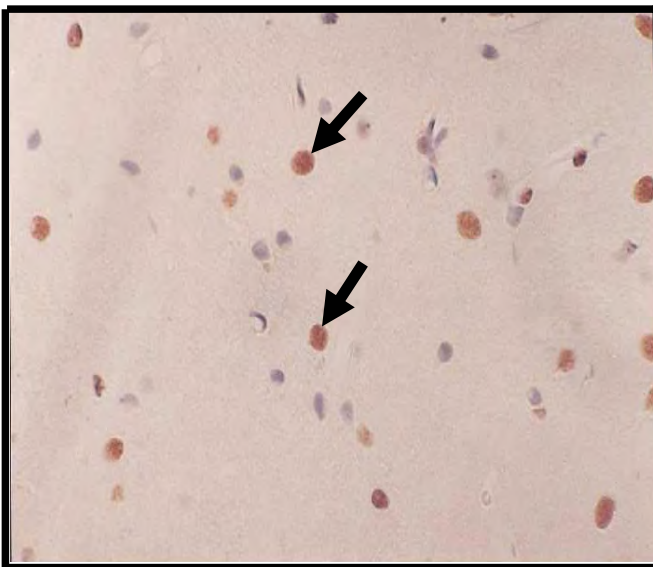


Fig. 8. Técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo Caspasa-3 en hipocampo de rata con isquemia cerebral focal de 15 min. Se muestran núcleos marcados indicando la expresión de la caspasa (200x).

CASPASA-9

ESTRIADO: La inmunohistoquímica con caspasa 9 en estriado mostró positividad nuclear, aunque de manera menos intensa que con caspasa 3 (Fig. 9).

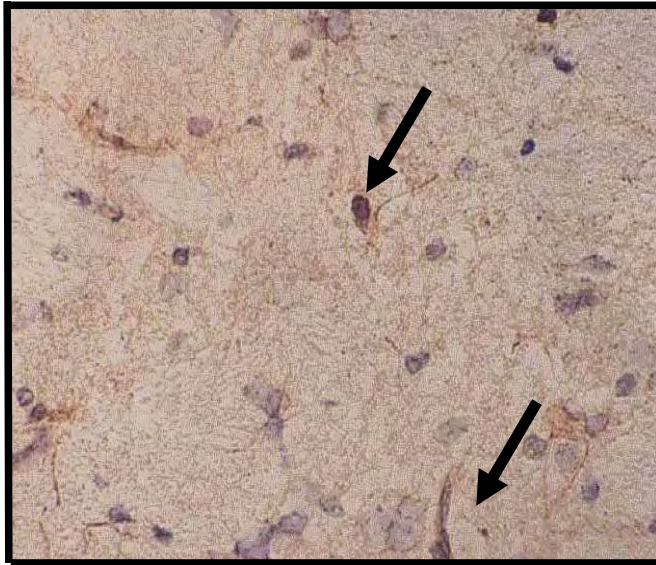


Fig.9.Técnica inmunohistoquímica con el anticuerpo Caspasa 9 en estriado de rata con isquemia cerebral focal de 15 min. Se muestran núcleos marcados indicando la expresión de la caspasa (200x).

HIPOCAMPO: se observó positividad nuclear escasa en la zona de interneuronas, esto debido muy posiblemente a la susceptibilidad neuronal de esta región (Fig.10).

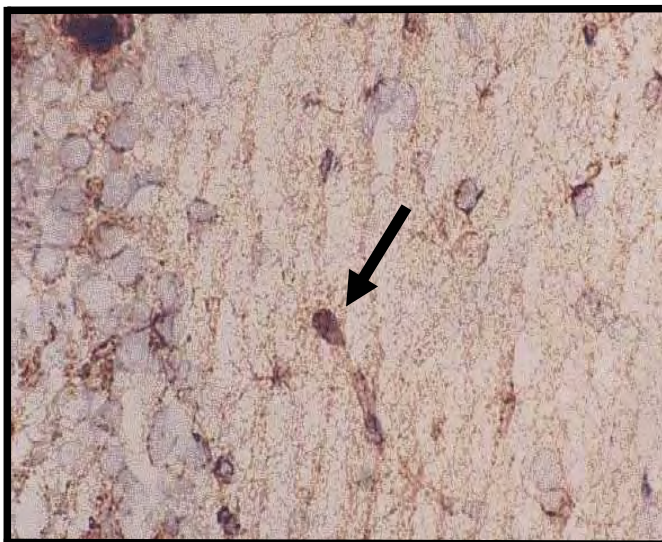


Fig. 10. Corte de hipocampo de rata con isquemia cerebral focal de 15 min sometido a la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo Caspasa 9. Se muestra un núcleo de neurona teñido (flecha) indicando la expresión de la caspasa 9 (200x).

AQUAPORINA - 4

ESTRIADO: se observaron vasos sanguíneos, células endoteliales y células de la glía marcados positivamente, siendo una vez más esta región cualitativamente, la de mayor positividad comparada con el hipocampo (Fig. 11).

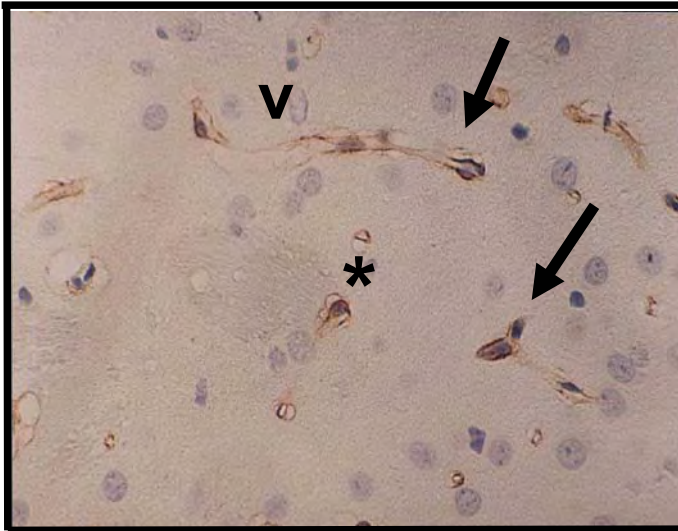


Fig. 11 Inmunohistoquímica con anticuerpo aquaporina 4 en cuerpo estriado de rata con isquemia cerebral focal. Se puede apreciar en tonalidad café la detección en vasos sanguíneos (v), células de la glía (asterisco) y células endoteliales (flecha) (200X).

HIPOCAMPO: en esta región se encontró positividad más tenue a lo largo de los vasos sanguíneos, en sus células endoteliales y en algunas células de la glía (Fig. 12).



Fig. 12. Inmunohistoquímica con anticuerpo aquaporina 4 en hipocampo de rata con isquemia cerebral focal. Se puede observar la marca en las células endoteliales (flecha) a lo largo de los vasos sanguíneos y en una célula de la glía (asterisco) (200X).

VEGF

ESTRIADO: mostró positividad marcada en toda la región del cuerpo estriado, siendo evidente la presencia del VEGF en las células neuronales (Fig. 13).

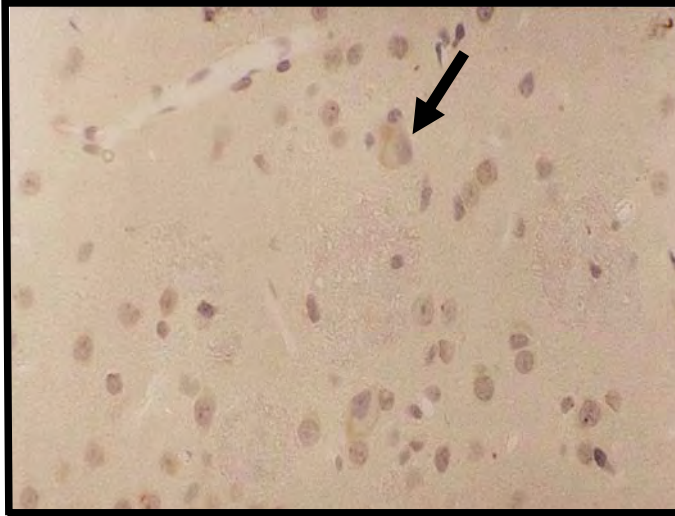


Fig. 13. Corte de cuerpo estriado teñido por la técnica de inmunohistoquímica, en la que se muestra la detección de VEGF en las neuronas (flecha) (200 X).

HIPOCAMPO: no fue tan marcada la positividad, pero fue más evidente en las interneuronas. Comparando ambas regiones (Hip-Est), fue claro que hubo mayor positividad nuclear en cuerpo estriado (Fig. 14).

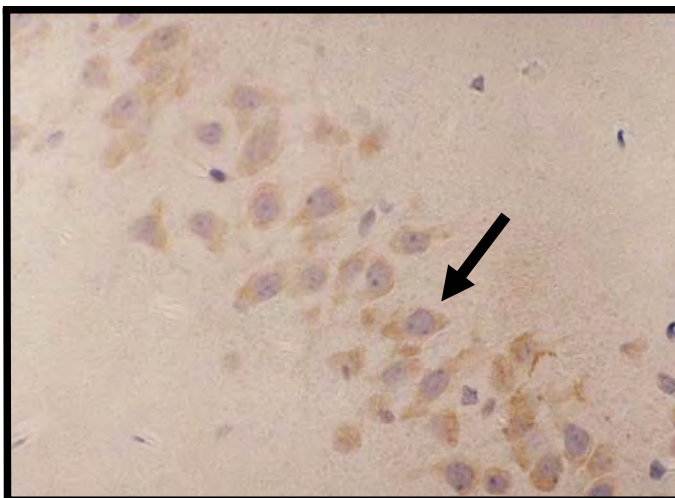


Fig.14. Inmunohistoquímica con el anticuerpo VEGF en hipocampo de rata con isquemia cerebral focal. La flecha señala a las neuronas piramidales marcadas, indicando la detección positiva.

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL

CONTROLES

ESTRIADO

En los cortes de 1 μm de grosor (semifinos) teñidos con azul de toluidina en el grupo de ratas control, se apreciaron células uniformes y estructuralmente bien conservadas (Fig. 15).

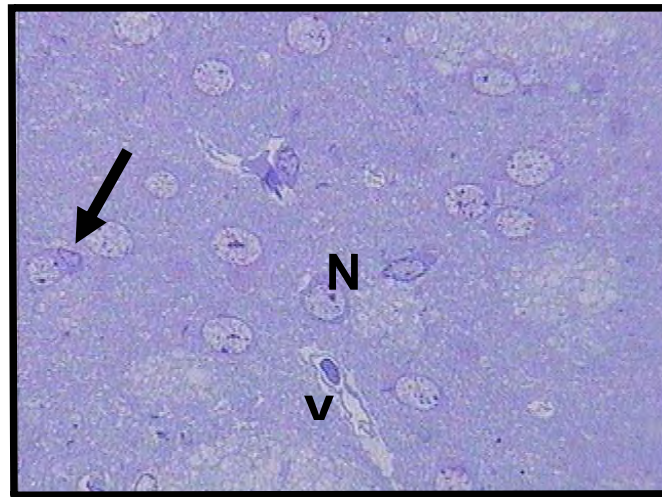


Fig. 15. Corte de 1 μm teñido con azul de toluidina de cuerpo estriado de rata control. Se muestran neuronas bien conservadas (N), vaso sanguíneo con una célula endotelial (v) y un astrocito junto a una neurona (flecha) (400 X).

HIPOCAMPO

En esta región se observaron células bien conservadas de apariencia normal, tanto en la zona de las neuronas piramidales como las interneuronas, las cuales mostraron cuerpos celulares y núcleos muy bien definidos y membrana claramente delimitada (Fig. 16)

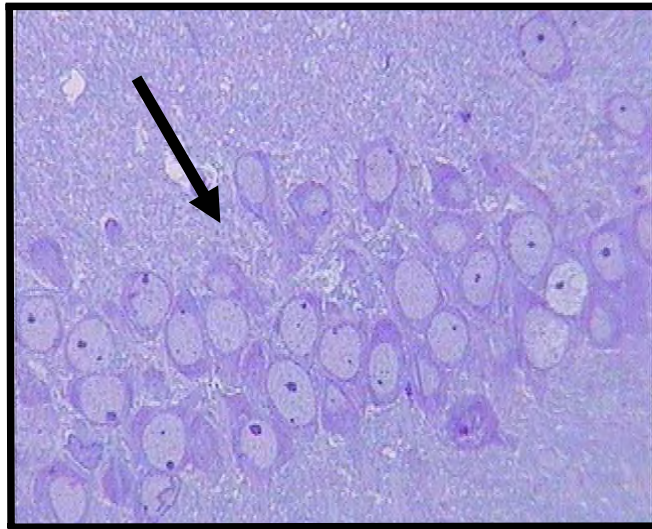


Fig. 16. Corte de 1 μm de la región del hipocampo de rata control, teñido con azul de toluidina. Se muestra en el centro de la imagen neuronas piramidales muy bien conservadas, manteniendo su arquitectura y con apariencia normal (flecha, 400x).

Isquemia 15 min.***ESTRIADO***

En los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina se observaron neuronas con pérdida de volumen celular y deformadas con apariencia de pasa (Fig.17).

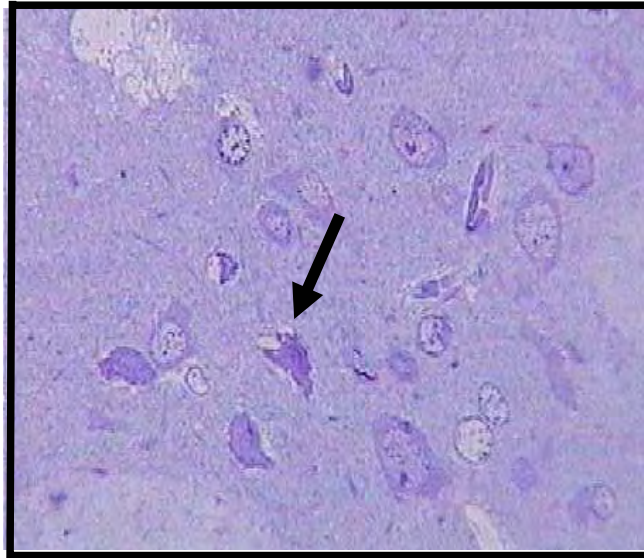


Fig. 17. Corte histológico de 1 μ m teñido con azul de toluidina, de cuerpo estriado de rata con isquemia cerebral focal de 15 min. Se muestran células encogidas, picnóticas y con un citoplasma muy dañado (flecha, 400x).

HIPOCAMPO

La tinción con azul de toluidina en esta región, dejó ver un notable daño en las interneuronas, mostrando células condensadas con núcleo deforme, mostrando pérdida de su morfología normal. También se observaron neuronas dañadas dentro de las células piramidales (Fig. 18).

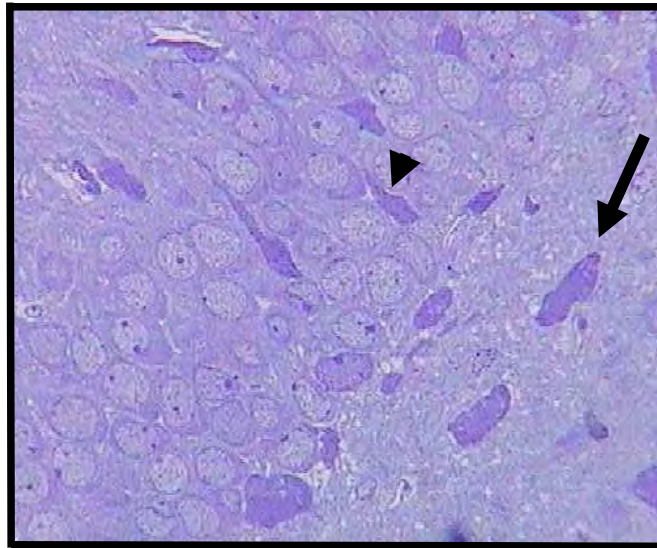


Fig. 18. Corte de 1 μm teñido con azul de toluidina de hipocampo en rata con isquemia cerebral focal de 15 min. Se muestran interneuronas con pérdida de volumen citoplásmico (flecha) y neuronas piramidales picnóticas (cabeza de flecha, 400x).

Microscopía electrónica

CONTROLES

ESTRIADO

El grupo control en cortes ultrafinos, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, al microscopio electrónico de transmisión mostró claramente neuronas de apariencia conservada, con citoplasma muy bien definido y núcleos con límites membranales nítidos (Fig. 19).

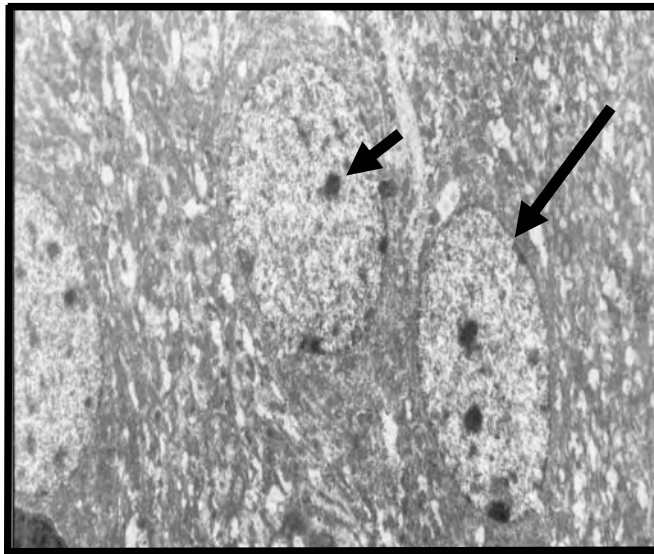


Fig. 19. Micrografía electrónica de un corte ultrafino de cuerpo estriado de rata control. Se observan neuronas conservadas con núcleos nítidos (flecha) mostrando pequeños acúmulos de cromatina. Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo, (7,056 X).

HIPOCAMPO

El hipocampo, al igual que el cuerpo estriado, se encontró con neuronas muy bien definidas sin alteraciones morfológicas (Fig. 20).

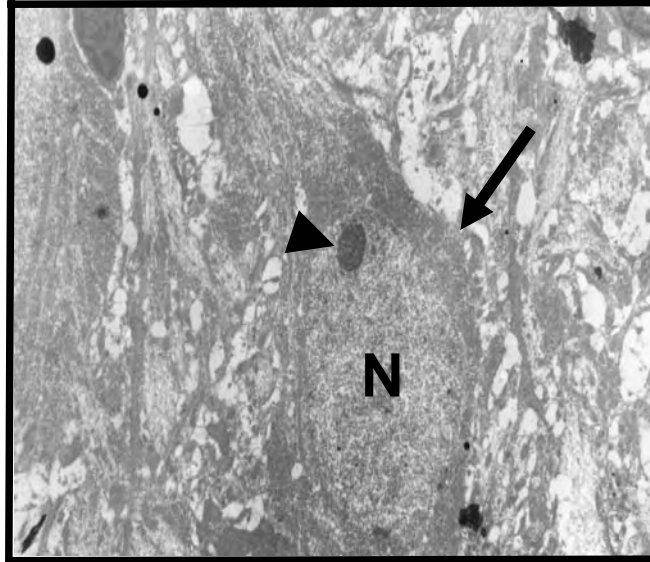


Fig. 20. Foto tomada al microscopio electrónico de transmisión de un corte ultrafino de hipocampo de rata control, en la que se aprecia una neurona con citoplasma muy bien delimitado (flecha), núcleo (N) y nucléolo nítido (cabeza de flecha). Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo (7,056 X).

Isquemia Cerebral Focal De 15 Min.***ESTRIADO***

En los cortes ultra finos contrastados con acetato de uranilo - citrato de plomo, se observaron células con pérdida de volumen (encogidas) y deformadas; el núcleo mostró cromatina arreglada en grumos gruesos. El estriado resultó con neuronas más dañadas que el hipocampo (Fig. 21).

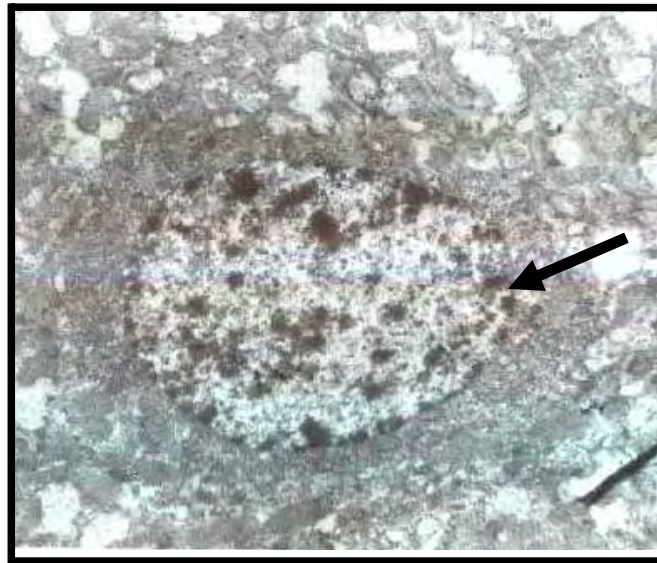


Fig. 21. Micrografía electrónica de transmisión de cuerpo estriado de rata con isquemia cerebral focal, en la que se muestra una neurona con pérdida de volumen celular y núcleo con cromatina en grumos gruesos (flecha). (Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo, 13,824 X).

HIPOCAMPO

Las células afectadas presentan como característica citoplasma disminuido, núcleo encogido y la membrana celular presenta invaginaciones. En algunos casos se aprecia principios de edema citotóxico (hinchamiento celular) (Fig. 22).

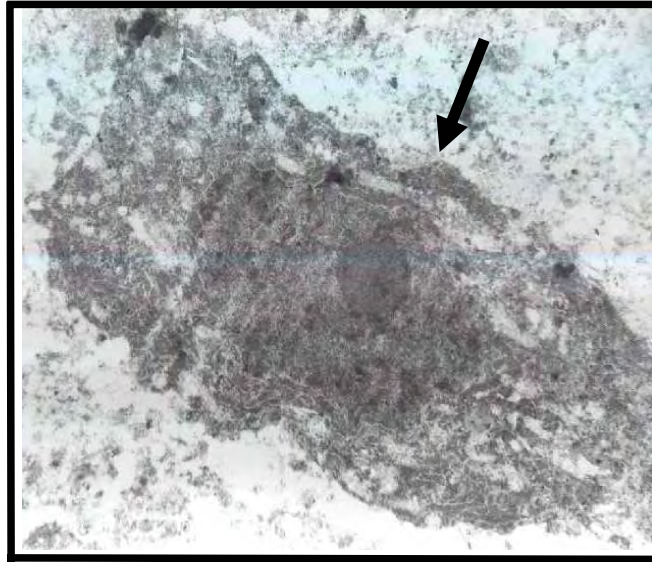


Fig. 22. Corte ultrafino de hipocampo en rata con isquemia cerebral focal, en donde se puede apreciar una interneurona deformada con pérdida de volumen celular, núcleo en posición central el cual presenta alteración en su circunferencia producto de la isquemia cerebral focal (Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo 13,824 X).

Discusión

El avance en el tratamiento de la isquemia cerebral humana, es debido al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y al descubrimiento de fármacos neuroprotectores eficaces que eviten la progresión del infarto y a su vez, que rescaten la zona de tejido cerebral que con el transcurso del tiempo podría incorporarse al núcleo del infarto (zona de penumbra isquémica) (Mostacero, 1999).

Los modelos animales de experimentación descritos hasta la actualidad constituyen el mejor banco de pruebas y es indudable que una gran parte de la información que poseemos en la actualidad sobre el cuidado del enfermo isquémico proviene de esta fuente (Alcaraz, 2004), de aquí la importancia de este trabajo de investigación, puesto que revela detalles importantes en cuanto al daño ocasionado por isquemia cerebral bajo un modelo experimental.

Debemos señalar que en el encéfalo no todas las células sufren por igual el efecto de la isquemia, algunos grupos celulares son más sensibles que otros al proceso isquémico, a este hecho se le puede denominar vulnerabilidad celular isquémica (Arango-Dávila, 2004) y se comporta de la siguiente forma: Las neuronas son las más sensibles a la hipoxia, les siguen en orden las células de la glia (neuroglia) y por último las células del endotelio vascular, las cuales son más resistentes. Dentro del grupo de las neuronas, aquellas que se encuentran en la corteza cerebral, en especial, en las capas III, IV y V son las que más sufren al igual que las situadas en el hipocampo, también lo son las células del cuerpo estriado y las células de Purkinje, estas últimas pertenecientes al cerebelo. A su vez, de las células pertenecientes a la glía, es la oligodendroglia la que primero se afecta, posteriormente el astrocito y por último la microglia, la cual procede del mesodermo y no del ectodermo como el resto de las células del tejido nervioso, además son las encargadas de la función de defensa, quizás es por esta explicación que sean las más resistentes a la isquemia (Aronowski J, 1996).

Se han reportado cambios celulares en hipocampo a 12 minutos de isquemia cerebral focal relacionados con muerte celular por apoptosis en isquemia cerebral (Ortiz, 2005). Las alteraciones celulares trascurridos los 15 minutos de isquemia fueron notables y se encontraron células intercaladas en ambas regiones cerebrales con disminución del volumen citoplásmico y núcleos picnóticos con cromatina condensada, dichas alteraciones fueron más evidentes en el cuerpo estriado. Estas evidencias sugirieron cambios celulares compatibles con apoptosis, que después fueron apoyados por el análisis de la fragmentación del ADN detectado de manera directa en el tejido por la técnica de TUNEL.

Hay estudios que apoyan la presencia de apoptosis después de la inducción de isquemia cerebral focal de corta duración, pero estas son observaciones a diferentes tiempos de reperusión y otros muestran daño necrótico y presencia de células apoptóticas en regiones de daño isquémico moderado (Janicke, 2004). En estos trabajos se sugiere que la presencia de muerte celular por apoptosis es producto de los mecanismos de daño desencadenados por la reperusión (Astrup J, 1981).

En la muerte celular por apoptosis se activan varios procesos previos que conducen a la muerte celular. Uno de ellos, es la activación de la cascada de caspasas en donde participan activamente, entre muchas otras, la caspasa 3 y la caspasa 9, las cuales son moléculas que participan en el proceso de la isquemia cerebral (Guevara, 2004).

En la isquemia cerebral se ha demostrado el papel activo que desempeñan estas caspasas y el efecto que causan en el cerebro dañado (Lum, 2005), de ahí la importancia de investigar qué es lo que ocurre con la caspasa 3 y la caspasa 9 en la isquemia cerebral focal del hemisferio izquierdo en un modelo de rata, específicamente en las regiones del estriado e hipocampo. En el presente trabajo se obtuvieron resultados interesantes, en donde se observó que el cuerpo estriado mostró cualitativamente mayor positividad celular para estas caspasas en casi todos los casos, mientras que en el hipocampo fue menor, siendo esta más evidente entre las interneuronas y la zona piramidal.

De este modo se sugiere que el cuerpo estriado es más sensible al ataque isquémico cerebral focal en comparación con el hipocampo.

El preconditionamiento isquémico es un término utilizado para explicar como una isquemia breve hace que un tejido, bajo esta situación, sea más resistente a una isquemia subsecuente de mayor duración. El preconditionamiento es un fenómeno reproducible, pero sus mecanismos no son aun completamente comprendidos. Protege neuronas y al mismo tiempo preserva la función del cerebro. Un número de mecanismos y moléculas han sido relacionados con varios tipos de preconditionamiento, estos incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual es uno de los principales mediadores en el proceso angiogénico que es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, desafortunadamente no se ha demostrado su aprovechamiento sistémico. Sin embargo estudios recientes han demostrado que un anticuerpo específico anti-VEGF podría inhibir el crecimiento tumoral en modelos de animales, de esta manera comenzó el desarrollo de una versión humana del anticuerpo VEGF (Storkebaum, 2004). VEGF es un factor de permeabilidad vascular potente, incrementa la permeabilidad a las proteínas del plasma sanguíneo y su expresión es regulada por la concentración local de oxígeno por lo que eleva su expresión en condiciones de hipoxia (Gang, 2002).

En este trabajo se encontró que el VEGF al igual que con las caspasas 3 y 9, presentó mayor positividad en cuerpo estriado, siendo esta mucho mas evidente que en el hipocampo, sugiriendo de este modo que hay una mayor respuesta a la isquemia y un alto estímulo de regeneración de vasos sanguíneos en cuerpo estriado (Cobbs, 1998).

Por otra parte se ha demostrado que las aquaporinas (AQP), que son proteínas integrales de membrana que conducen selectivamente las moléculas de agua dentro y fuera de la célula, previenen la penetración a la célula de otros solutos y son importantes en el mecanismo de regulación de la presión intraocular e intracraneal, migración celular, edema cerebral y otras funciones (Hiroaki, 2006). Se han reportado estudios de la expresión de las AQP en la mitocondria, sugiriendo que tienen posible participación en el metabolismo y en la apoptosis

asi como en la patogénesis de enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson (Hiroaki, 2006).

Como resultado en este trabajo con AQP4, se encontraron células endoteliales y de la glía positivas, así como en el contorno de los vasos sanguíneos. Las células de la glía, más específicamente los astrocitos, mostraron expresión de ésta proteína. Los astrocitos rodean a los vasos sanguíneos con prolongaciones de su membrana plasmática, contribuyendo con la barrera hematoencefálica en la regulación de la permeabilidad del agua y las macromoléculas (King, 2004). Badaut (2002) en un estudio de las AQ's en el cerebro, reportó expresión elevada de AQ4 y AQ9 en la patofisiología de la isquemia cerebral, mostrando su participación en el desarrollo del edema.

La detección de la expresión de la AQ4 en el presente trabajo, sugiere que el daño celular producido por la isquemia cerebral focal se presenta desde los primeros minutos de la isquemia cerebral, ya que la presencia de esta proteína indica los cambios en la permeabilidad de la membrana celular y el inicio del edema citotóxico. La expresión de AQ4 fue mas intensa en el cuerpo estriado que en hipocampo, correlacionando con los resultados obtenidos con caspasa y VEGF, mostrando que el estriado se ve más afectado con el proceso isquémico.

Conclusiones.

En diferentes trabajos, se han realizado estimaciones directas del tamaño del infarto producto de la isquemia cerebral focal, a diferentes tiempos pero bajo condiciones de reperfusión, sin embargo, los resultados que aquí se presentan muestran un panorama sobre las regiones cerebrales que se ven más severamente afectadas.

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido, evaluar las alteraciones celulares producidas en cuerpo estriado e hipocampo por isquemia cerebral focal, sin reperfusión, del hemisferio izquierdo en un modelo de rata, para lo cual se emplearon diferentes técnicas con las que se ha podido determinar cualitativamente el daño. Los resultados muestran que la región del estriado sufre mayor daño desde los primeros minutos de comenzada la isquemia, en comparación con el hipocampo, revelando la susceptibilidad y vulnerabilidad celular que tiene esta región en el proceso isquémico.

Perspectivas

Averiguar el progreso del daño celular en la isquemia a tiempos más largos y con reperfusión.

Caracterizar el daño celular apoptótico, averiguando la presencia de las diferentes proteínas que participan en este proceso.

Anexo I**PBS 0.1 M pH: 7.4**

* SOLUCIÓN CONCENTRADA (2x)

Solución A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 27.598 g

H_2O - 1000 ml

Solución B

NaH_2PO_4 anhidro - 28.39g

H_2O - 1000 ml

* SOLUCIÓN DE TRABAJO

Agregar la solución A, a la solución B, poco a poco hasta obtener un pH de 7.4. Diluir la solución por partes iguales (1:1) con agua destilada y agregar 0.8 g de NaCl por cada 100 ml.

Paraformaldehído 4%

Paraformaldehído - 4g

PBS 0.1 M pH 7.4 - 100 ml.

NaOH 1M

NaOH - 2 gr. de en 50 ml de agua destilada.

Se agrega el paraformaldehído al agua y se disuelve por agitación en plancha caliente (no mas de 60° C, ya que si se excede esta temperatura el paraformaldehído se transforma en aldehído) y dentro de una campana de extracción hasta que se disuelva lo más posible. Para lograr que se disuelva y que la solución quede transparente, se agrega NaOH 1M gota a gota hasta que la solución de paraformaldehído quede transparente, después se deja enfriar a temperatura ambiente y se almacena a 4° C.

Procesamiento de material biológico

Los tejidos fueron deshidratados en soluciones de alcohol y preincluidos en parafina en un procesador automático de tejidos, permaneciendo una hora en cada uno de ellos en el siguiente orden:

- Alcohol 70%
- Alcohol 80%
- Alcohol 96%
- Alcohol 96%
- Alcohol 100%
- Alcohol 100%
- Alcohol 100%
- 3 baños de Xilol 100%
- 2 baños de parafina

Anexo II

Desparafinar e Hidratar

- Dos baños de Xilol de 10 minutos
- Xilol/Alcohol absoluto 1:1 por 3 minutos
- Dos baños de alcohol absoluto por 3 minutos
- Dos baños de alcohol 96% por 3 minutos
- Alcohol 80% por tres minutos
- Agua corriente por 3 minutos.

Preparación de Hematoxilina de Gill

Agua destilada - 730 ml

Etilen Glicol - 250 ml

Hematoxilina anhidra polvo - 2g

Yodato de Sodio - 0.2 g.

Sulfato de Aluminio - 17.6 g.

Ácido Acético - 2 ml

Filtrar

Preparación de Eosina

* Solución Madre

Eosina - 1 g.

Agua - 20 ml

Etanol 96% - 80 ml

* Solución de trabajo

Una parte de solución Madre

Tres partes de Etanol 96%

Ac. Acético -1 ml.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Sumergir en hematoxilina 3 minutos

Enjuagar con agua destilada 2 veces

Virar con solución saturada de carbonato de litio durante 2 minutos

Enjuagar una vez más en agua destilada

Sumergir en eosina durante 2 minutos

Deshidratar

Alcohol 80% por 3 minutos

Dos baños de Alcohol 96% por 3 minutos

Dos baños de Absoluto por 3 minutos

Dos baños de Xilol/Alcohol 1:1 por 3 minutos

Montar en resina Entellan.

Anexo III

PRETRATAMIENTO DE LAS LAMINILLAS CON SILANO (3-Aminopropyltriethoxy-silane) AL 2%.

Acetona - 245 ml

Silano - 5 ml

2 minutos en silano.

2 minutos en agua.

Dejar secar en un horno a 60 °C por 2 horas

Amortiguador de citratos 10 mM pH 6.

Solución de trabajo:

Acido Citrico 0.1 M (Acido) – 9 ml.

Citrato de Sódio 0.1 M (Base) – 41 ml.

La solución de trabajo se afora a 500 ml con agua desionizada.

Proteinasa K.

20µg/ml

Tris/HCl pH 7.4 - 10 mM

Mezcla de TUNEL para una laminilla, según las instrucciones del fabricante

Solución enzimática – 3 µl

Solución de Marcaje – 27 µl

Control Positivo.

Tejido incubado con Dnasa I (12.5 µl de Dnasa + 5µl Cl₂Mg 25 mM + 32.5 Amortiguador PCR 1X)

Control Negativo.

Se agregó solución de marcaje sin la enzima transferasa terminal, enjuagar 2 veces en PBS.

Anexo IV

POLY L LISINA al 2%

Agua destiliada 98 ml

Poly L Lisina 2 ml

Sumergir las laminillas en la solución por 5 min en un recipiente de plástico. Retirar y escurrir las laminillas y dejar secar en la estufa a 60° C.

Inmunohistoquímica

Solución stock de albúmina bovina al 1%.

Albúmina bovina -1 gr.
PBS - 100 ml.

PBS-Triton.

Tritón - 50 µL
PBS al 0.1 M pH 7.4 - 50 ml.

Se tomaron 50 microlitros de triton y se adicionaron a los 50 ml de PBS previamente medidos.

Se agita en el brotex hasta que el tritón se disuelve.

Peroxido de Hidrogeno al 0.3%

Agua destilada - 50 ml.
Peróxido de hidrogeno al 30% - 400 µl.

Anexo V

Microscopía Electrónica.

Preparación de fijador para microscopía electrónica

Glutaraldehido al 25% - 100 ml.

Paraformaldehido al 4% en PBS 0.1M pH 7.4 - 1000 ml.

Deshidratación.

Alcohol 70%
Alcohol 90% } 1 h c/u
Alcohol 100% }

OH 100% / resina LR-W

2:1
1:1 } 3 h c/u
1:2 }

Resina pura LR-White 3 cambios de 1h cada uno

Inclusión en resina LR-White en cápsulas de gelatina

Polimerizar a 60°C durante 18 h.

Realizar cortes a 1µm

Teñir con azul de toluidina

Observar en el microscopio óptico

Cortar finos a 60 nm

Contrastar con Ur-Pb

Observar en el microscopio electrónico de transmisión

Preparación de Azul de Toluidina.

Azul de Toluidina -1 g.

Tetraborato de Sodio - 1 g.

Agua destilada - 100 ml.

Preparación de contrastantes

Acetato de uranilo 3%.

Acetato de Uranilo - 300 mg

Agua bidestilada -10 ml

Disolver el uranilo en agua.

Ajustar el pH a 4.5 con NaOH 10 N (0.4 g de NaOH en 10 ml)

Centrifugar por 10 min a 300 rpm

Guardar a 4° en oscuridad

Citrato de Plomo.

Citrato de Plomo - 30 mg

Agua bidestilada -10 ml

Disolver el plomo en agua bidestilada hervida por varios minutos y fría, agitar por varios minutos y agregar NaOH 10 N hasta aclarar y que obtenga un pH de 12. Centrifugar por 10 min, guardar a 4° en oscuridad.

GLOSARIO

- **Aneurisma:** es una dilatación localizada de una arteria o vena ocasionada por una degeneración de la pared. Los aneurismas más frecuentes son los arteriales y su localización más habitual radica en la base del cerebro.
- **Apoptosis:** es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, también llamada muerte celular programada.
- **Edema Cerebral:** es un proceso osmótico mediante el cual las neuronas cerebrales aumentan su tamaño debido a un aumento anormal del volumen de plasma intracraneal, pudiendo llegar a la lisis celular. Las principales causas son isquemia, accidentes vasculares cerebrales y traumatismos craneoencefálicos.
- **Estriado:** es una región del cerebro de sustancia gris situada en la base del cerebro y en la parte externa de cada uno de sus ventrículos laterales.
- **Glucólisis:** es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula.
- **Hipocampo:** es una parte del cerebro situado en el lóbulo temporal. Forma una parte del sistema límbico y participa en la memoria y la orientación espacial.
- **Isquemia Cerebral Focal:** es una enfermedad ocasionada por la llegada deficitaria de sangre, y por lo tanto de oxígeno, a un área del cerebro.

- **Necrosis:** es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar o curar, como por ejemplo el aporte insuficiente de sangre (isquemia).
- **Oclusión Cerebral:** es un mecanismo patofisiológico de las arterias cerebrales provocadas por trombos o émbolos.
- **Perfusión:** administración de un medicamento (sol. salina) con la finalidad de limpiar los órganos de la rata.
- **Reperfusión:** recuperación del flujo sanguíneo después del daño isquémico
- **Trombosis:** es la aparición de un coágulo dentro del torrente circulatorio, se produce cuando los coágulos obstruyen las venas, llamada trombosis venosa o las arterias, llamadas trombosis arterial.

Bibliografía

Adams, D. R Principios de Neurología. Mc. Graw Hill Interamericana USA 679. 53-64, 1998.

Alcaraz Zubeldia y Ríos Castañeda Camilo. Isquemia cerebral. Temas selectos de neurociencias III. Ed. Javier Velázquez Moctezuma UAM 1-1, 2004.

Alonso Leciñana María, Diez-Tejedor Exuperio, Carceller Fernando, Roda Jose María Cerebral Ischemia: From Animal Studies to Clinical Practice. Should the Methods Be Reviewed?. *Cerebrovascular Diseases*;11:20-30, 2001.

Alonso, M. Y E. Diez Fisiopatología de la Isquemia vertebrobasilar *Revista de Neurologia* 26 (149). 106-113, 1998.

Arango-Davila C, Escobar-Betancourt M,. Cardona-Gómez G.P, Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*; 39(2): 156-165, 2004.

Arends, M. J; Morris, R. G Y Wyllie, A. H. Apoptosis : the endonucleasa *American Journal of Pathology* 136 : 539-608, 1992.

Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC. An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficit. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 705-713, 1996.

Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia: The ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725, 1981.

Badaut J, Lasbennes F and Regli Luca Aquaporins in brain: distribution, physiology and pathophysiology. *Journal of cerebral blood flow & metabolism* 22: 367-378, 2002.

Bielawska-AE; Shapio-JP, Jiang-L, Melkonyan-HS, Piot-C, Wolfe-CL. Tomei-LD, Hannum-YA, Umansky-SR. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 151 (5); 1257-63, 1997.

Bursch W, A. Ellinger Ch. Gerner, U. Frohwein and R. Schulte-Hermann. Programmed cell death (PCD). *Ann. N. Y. Acad.* 1-12, 2002.

Castillo J, Martí-Vilalta JL, Martínez-Vila E, Matías-Guiu J. Manual de enfermedades vasculares cerebrales. Barcelona, España, 1999.

Castillo J, Rodríguez. Biochemical Changes and Inflammatory Response as Markers for Brain Ischaemia: Molecular Markers of Diagnostic Utility and Prognosis in Human Clinical Practice. *Cerebrovascular Diseases*, 17:7-18, 2004.

Cobbs Ch S, Jun Chen, Steven HG. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience Letters* 249, 79-82, 1998.

Corbett D., Nurse S., Colbourne F. Hypothermic neuroprotection. A global ischemia study using 18- to 20- month old gerbils. *Stroke*, 28:2238, (1997).

Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol*, 54: 531-548, (1998).

Charriaut-Mariange C; Remolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia *Biochem Pharmacol* 52(6) 264-9, 1998.

Diez-Tejedor, E. O. H, del Brutto, J. Alvarez-Sabín, M. Muños Collazos. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de ECV. *Rev Neurology*; 33:455-464, 2001.

Fisher M. El objetivo del tratamiento en la enfermedad cerebrovascular aguda y los enfoques terapéuticos neuroprotectores. *Rev Neurol* , 29:536-544, 1999.

Fisher M. The ischemic penumbra—identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis*, 17(Suppl 1):1–6, 2004.

Gang ZZ, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, Goussev A, Powers C, YeiCH T, Chopp M. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain-barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2:379-392, 2002.

Guevara García Mariela, Rodríguez Raisa, Álvarez León Alina, Riaño Montalvo Annia, Rodríguez P.C. Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica, *Rev Cubana Med*; 43(4), 2004.

Hacke W. Neuroprotective strategies for early intervention in acute ischemic stroke. *Cerebrovascular disease (Suppl)*4, 317-322, 1997.

Hakim A. M. The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol. Sci*14: 557-559, 1987.

Hiroaki, Yang B, Zhao D, Verkman A.S. Evidence against functionally significant aquaporin expression in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 281(24), 16202-16206, 2006.

Hiroaki Yoko, Yang B, Zhao D, Verkman. A.S. Implications of the Aquaporin-4 structure on array formation and cell. *Adhesion J. Mot. Biol.* 355, 628-639, 2006.

Janicke, R. U; M.R Wati. Caspase 3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273. 9357-9360, 2004.

Kamryn T. Eddy, Marian Tanofsky-Kraff, Heather Thompson-Brenner, David B. Herzog, Timothy A. Brown, and David S. Ludwig. Eating disorder pathology among overweight treatment-seeking youth: Clinical correlates and cross-sectional risk modeling. *Behaviour Research and Therapy*. Vol. 45, Issue 10, 2360-2371, 2007.

King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease. The evolving tale of aquaporin biology. *Mol Cell Biol.* 5:687 – 698, 2004.

Kirino, T. Ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Meta.*, 22:1283–1296, 2002.

K.L. JIN, O. MAO. T. Nagayama and D.A Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor 1 by global ischemia in rat brain. *Neuroscience*. Vol. 99 No. 3. 577-585, 2000.

Kylan Lynch John , DO, G Deborah. Hirtz, MD, DeVeber Gabrielle, MD and Karin B. Nelson, MD. Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. *Pediatrics* Vol. 109 No. 1 116-123, 2002.

Leciñana María Alonso, Diez-Tejedor Exuperio, Carceller Fernando, Roda Jose María. Cerebral Ischemia: From Animal Studies to Clinical Practice. Should the Methods Be Reviewed?. *Cerebrovascular Diseases*;11:20-30, 2001.

Lum J, Julian, Daniel E. Bauer, Mei Kong, Marian H. Harris, Chi Li, Tullia Lindsten, and Craig B. Thompson. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, Vol. 120, 237-248, 2005.

Margaill Isabelle, Plotkine Michel. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Issue 4*, 429-443, 2005.

Mark P. Mattson, Carsten Culmsee and Zai Fang Yu. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell tissue.* (301) 173-823, 2000.

Mergenthaler Philipp, Dirnagl Ulrich, Meisel Andreas. Pathophysiology of Stroke: Lessons From Animal Models *Metabolic Brain Disease*, Vol. 19, No. 3/4, December, 2004.

Mostacero E. Neurotoxicidad, neuroprotección y ventana terapéutica en la isquemia cerebral. *Rev Neurol*, 29 (6): 513-514,1999.

Nedergaard M. Spreading depression as contributor to ischemic brain damage *Adv Neurol* 71: 75-84, 1996.

Noda-T; Iwakiri-R, Fujimoto-k, Matsuo- S, Aw-TY Programed cell death. Induced by ischemia – reperfusion in rat intestinal mucosa *Am J. Physiol* Feb 274 (2 Pt 1); G270-6, 1998.

Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke*, 26: 644-649, 1995.

Ortiz-Plata A, Nader-Kawachi Juan, Guevara Jorge, Sandoval Carlos, Rembao Daniel, Hernandez-Hernandez Fidel de la Cruz. EGP-314 is expressed differentially in three brain zones at an early time in an experimentally induced ischemia rat model. *Mol Brain Res* 137:55-62, 2005.

Pacher, Armando. Aspectos de la apoptosis. *Revista virtual de medicina*. Vol. 1 N0. 2, 1-18, 1998.

Pérez Asensio FJ. Isquemia cerebral focal transitoria en rata: caracterización y utilidad del modelo de la sutura intraluminal en el estudio de estrategias neuroprotectoras. Tesis para optar al grado de doctor en ciencias biológicas. Universidad de Valencia, 2005.

Persson L, Hardemark H-G, Bolander HG, Hillered L, Olsson Y. Neurologic and neuropathologic outcome after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 20: 641-645, 1998.

Puurunen, Kirsi. The effects of pharmacotherapy and training on functional recovery after global and focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology*. Vol. 40, 597-606, 2001.

Prophet, Edna B, Bob Mills y Jacquelyn B. Arrington Métodos Histotecnológicos. Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995.

Rodríguez M. L., Galvizu S.R., Alvarez G.E. Neuromodulación farmacológica en la enfermedad cerebrovascular. Temas actualizados. *Rev. Cubana Med*, 41(2), 218-256, 2002.

Sabina Sperandio and Dale E. Bredesen. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Sperandio*. Vol. 97 (26), 14376-14381, 2000.

Sasaki-H, Matsuno-T, Nakagawa-K, Tanaka-N. Induction of apoptosis during the early phase of reperfusion after rat liver ischemia *Acta Med Okayama* 51 (6): 305-12, 1997.

Storkebaum EriK, Diether Lambrechts, and Peter Carmeliet. VEGF-Once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bio Essays* 26: 943-954, 2004.

Sweeney M. I, Yager I. Y-. Walz W; Juurlink B, H, J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*, 73; 1525-1535, 1995

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1:53-60, 1981.

Traysman R.J. Animals models of focal and global cerebral ischaemia. J. ILAR, 44 - 85, 2003.

Ulrika V. Mikel. Advanced laboratory methods in histology and pathology. (Ed.). Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

Yoshihiro Kobae. Immunochemical Analysis of Aquaporin isoforms in Arabidopsis suspension – cultured cell. Biosci. Biochem, 70 (4). 980-987, 2006.

Zahoor Ahmad Shah, Khodadad Namiranian, Judy Klaus, RN, Kathy Kibler, BS and Sylvain Doré. Use of an optimized transient occlusion of the middle cerebral artery protocol for the mouse stroke model Cerebrovascular. Disease Vol. 15, No. 4 (July-August), 133-138, 2006.

Zea, Longa E. Y P. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins. Stroke Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats 20 (1) 84-91, 1989.

Zhu C, X Wang and K Blomgren. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. Department of physiology, Goteborg University. 1-15, 2004.