

Artículo original

ISQUEMIA CEREBRAL: EVOLUCIÓN HISTOPATOLÓGICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL

César Augusto Arango-Dávila MD. PhD.^{1,2}, Alejandro Vera González MD. Candidato a PhD.^{1,3}

1. Grupo de Investigación Biomédica Universidad Icesi, Cali, Colombia

2. Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

3. Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas, Manizales, Colombia

RESUMEN

Introducción: la obstrucción aguda de la Arteria Cerebral Media produce disminución del flujo sanguíneo del territorio de irrigación correspondiente, lo cual desencadena un proceso de muerte y estrés celular que da lugar al foco isquémico y zona de penumbra respectivamente. Modificaciones en el citoesqueleto neuronal, glial y en el inmunofenotipo de la microglia son marcadores sensibles de sufrimiento celular. Hasta el momento no se ha evaluado la evolución de los diferentes compartimientos celulares en un modelo integrado que permite conocer la evolución citoarquitectónica del infarto. **Objetivos:** evaluar en un modelo de lesión isquémica experimental, los cambios en los compartimientos celulares del tejido cerebral y plantear un modelo estructural de evolución de la lesión. **Metodología:** 22 ratas machos Wistar, peso promedio de 280 gramos. Mediante la técnica de obstrucción intraluminal de la arteria cerebral media, con tiempo de reperusión de 3, 12, 24 y 72 horas. Se realizaron cortes histológicos procesados para coloración básica e inmunohistoquímica para MAP-2 (citoesqueleto neuronal), GFAP (citoesqueleto glial), HMC (microglía) y Caspasa-3 (actividad proteolítica). **Resultados:** se establece un modelo topográfico y secuencial de la respuesta del compartimiento neuronal y glial y de la reacción de la macroglía en la corteza cerebral isquémica. Se definen cuatro zonas con características fisiopatológicas definidas. **Conclusiones:** se genera una apreciación conjunta de la reacción de las diferentes células del cerebro ante la lesión isquémica y permite sentar las bases para la evaluación de sustancias con potencial neuroprotector. Aporta a la comprensión de la fisiopatología de la lesión cerebral isquémica.

Palabras claves: Isquemia focal experimental, MAP-2, penumbra isquémica, fisiopatología, GFAP, HMC.

Recibido: 14 de julio de 2014

Aceptado: 23 de mayo de 2016

Correspondencia: arangodavila@gmail.com

CEREBRAL ISCHEMIA: HISTOPATHOLOGICAL EVOLUTION IN AN EXPERIMENTAL MODEL

ABSTRACT

Introduction: Acute obstruction of the Middle Cerebral Artery results in decreased blood flow to the corresponding irrigated territory and triggers a process of cell death and stress that gives rise to an ischemic focus and penumbra, respectively. Changes in the neuronal cytoskeleton, glial and immunophenotype changes of the microglia are sensitive markers for cell distress. Up to now, the evolution of the various cell compartments has not been evaluated in a comprehensive model that enables the cyto-architectural evolution of infarction. **Objectives:** To assess in an experimental ischemic injury model any changes in the cell compartments of the brain tissue and suggest a structural model for the evolution of the lesion. **Methodology:** 22 male Wistar rats with average weight of 280 grams. The intraluminal obstruction technique of the middle cerebral artery, with perfusion times of 3, 12, 24 and 72 hours was used. Histological sections were processed for basic and immunohistochemical staining for MAP-2 (neuronal cytoskeleton), GFAP (glial cytoskeleton), HMC (microglia), and Caspase-3 (proteolytic activity). **Results:** A topographic and sequential model of the neuronal and glial compartment response and of the reaction of the macroglia in the ischemic cerebral cortex was established. Four zones with defined pathophysiological characteristics were defined. **Conclusions:** A joint appreciation of the reaction of the various brain cells to the ischemic injury was generated and allowed for setting the background to evaluate substances with neuroprotective potential. This helps to understand the pathophysiology of ischemic cerebral injuries. **Keywords:** Experimental focal ischemia, MAP-2, ischemic penumbra, pathophysiology, GFAP, HMC.

INTRODUCCIÓN

Los infartos cerebrales se definen como áreas de necrosis que se desarrollan en sitios donde ha ocurrido isquemia severa, la morfología es variada y puede consistir en infartos isquémicos o hemorrágicos. El infarto isquémico corresponde a una obstrucción irreversible con necrosis tisular, edema e inflamación, en el cual con el transcurso de las horas el tejido se licua y se generan soluciones de continuidad o necrosis colicuativa (1,2). El infarto hemorrágico es consecuencia de la reperfusión postisquémica, puede ser ocasionado por la reapertura de la luz arterial, por obstrucción parcial de la arteria o por suministro de sangre proveniente de otros vasos que irrigan el tejido necrótico. En los dos tipos de infartos, de igual manera se genera un foco necrótico y un área de penumbra (3).

Es llamativo que los experimentos *in vitro*, *in vivo* y preclínicos relacionados con la fisiopatología de la isque-

mia cerebral hayan permitido generar estrategias farmacológicas predecibles, que en una importante proporción de casos son eficaces (4,5), pero que al aplicarse en el ámbito clínico a la realidad de la enfermedad cerebrovascular en el hombre generan resultados desalentadores (6). Es posible que estos pobres resultados, tengan relación con el desconocimiento de la respuesta global del tejido, si se tiene en cuenta que el cerebro está constituido por tipos de células que reaccionan de forma diferente ante el estrés isquémico y que se desconocen muchos aspectos de la interacción de estas células en circunstancias de hipoxia (7-10).

Lipton P (11), señala cuatro etapas en el complejo proceso de muerte neuronal por isquemia. Las etapas de inducción de la isquemia y de los eventos perpetradores de la lesión han sido ampliamente estudiadas, se han descrito con metodologías *in vitro* y contrastadas con observaciones *in vivo*. Pero las últimas dos etapas que consisten en la disfunción celular y estructural y la pro-

gresión de los cambios bioquímicos y morfológicos a la condición de muerte celular han sido muy poco entendidas, incluyen la transición de los cambios fisiopatológicos a la realidad morfológica. La evaluación de estas etapas requiere de metodologías *in vivo*, e implica considerar múltiples variables no solo de la complejidad del tejido nervioso, sino del organismo en general.

Los cambios en el citoesqueleto neuronal y glial son marcadores sensibles de sufrimiento celular, la razón de esta sensibilidad y especificidad, está dada porque a las proteínas relacionadas con el citoesqueleto confluyen muchas vías de señalización y son muy proclives a cambios del microambiente celular (7-10). Desde hace varios años las proteínas asociadas a microtúbulos 2 (MAP-2) se han establecido como un sensible y específico indicador de respuesta neuronal a la isquemia (12-16). Durante las primeras horas después de la lesión se observa disminución de la inmunoreactividad a la MAP-2 en el foco y en el área periinfarto, y esta modificación del inmunofenotipo neuronal se puede interpretar como evidencia de estrés metabólico neuronal el cual puede ser reversible (15,17). Similar a los cambios que se observan en el citoesqueleto neuronal, en la isquemia cerebral también se observan cambios importantes y rápidos en el citoesqueleto de las células gliales. La GFAP es una proteína que presenta sitios para la fosforilación y es el sustrato de muchos tipos de proteínquinas, esto la hace muy sensible a varias vías de transducción de señales intracelulares que se activan en situaciones de estrés isquémico (11).

Con las neuronas y la glía se encuentra la microglía, la cual está constituida por un grupo de células de origen mesodérmico derivadas de los monocitos sanguíneos. Las células de la microglía, que en su función son similares a los macrófagos de la sangre, se pueden detectar y diferenciar de otras células del tejido nervioso mediante la marcación inmunohistoquímica de un antígeno específico que corresponde al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (18). Se ha observado que durante la isquemia cerebral, las células de la microglía se modifican rápidamente y se incrementa de forma importante la sensibilidad del MHC, esto da la posibilidad de observar variados inmunofenotipos que permiten reconocer diferentes estados funcionales de estas células

como son la microglía de reposo, la microglía activa y la microglía reactiva.

La falla energética y la despolarización isquémica ocasionan la entrada de calcio a las células y el incremento masivo de calcio en la mitocondria, lo que causa la liberación del *citocromo c* de esta organela, el cual en el citoplasma genera la formación del complejo *citocromo c*-proteína proapoptótica BAD-Apaf (Factor Asociado a la Apoptosis). Este complejo, es capaz de activar la caspasa 3 y otras proteasas de cisteína las cuales se han relacionado con la fase efectora de la apoptosis, pero que en el caso de la necrosis, participa en los procesos de muerte celular por su capacidad de digerir proteínas vitales para la célula como proteínas estructurales del citoesqueleto entre otras (19-21) y en este caso no corresponde a fenómenos de muerte celular programada, son una evidencia de activación de proteasas durante los procesos necróticos.

El presente trabajo consiste en la evaluación mediante técnicas inmunohistoquímicas de los cambios en las diferentes células que constituyen el tejido cerebral, después de una lesión isquémica focal experimental con reperfusión en el territorio de la Arteria Cerebral Media (ACM) en ratas Wistar adultas. Este trabajo genera una apreciación en conjunto de la reacción de las diferentes células y permite aproximarse a una reconstrucción citoarquitectónica que puede sentar las bases, para la evaluación de sustancias con potencial neuroprotector, en la cual se tiene en cuenta la simultaneidad de la reacción tisular así como la posible interacción de los diferentes tipos de células, tanto en el foco isquémico como en el área de penumbra y sectores alejados del foco isquémico. Además, aporta a la comprensión de la fisiopatología de la lesión vascular cerebral.

METODOLOGÍA

Técnica quirúrgica de la isquemia cerebral y proceso de las muestras

Se intervinieron 22 ratas machos Wistar adultas, con un peso entre 240 y 320 gramos (promedio 280 gramos), con edad entre 120 y 180 días. El protocolo experimental fue evaluado y autorizado por el comité de ética de la

Universidad del Valle, cumple la normativa vigente de la Comunidad Económica Europea para el uso y cuidado de los animales utilizados para la experimentación y otras finalidades científicas (Strasbourg, 15 junio del 2006) y de la legislación colombiana (Ley 84 de 1989 y Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud) sobre ética, cuidado y control de animales para fines experimentales.

Los animales experimentales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (40 mg/kg) y atropina (0.1 mg/kg) vía intraperitoneal, durante el procedimiento quirúrgico se evaluó regularmente la función cardiorrespiratoria y la temperatura rectal. La técnica de isquemia cerebral aplicada en este trabajo fue desarrollada por Zea Longa y cols. (22) y perfeccionada por Belayeb y cols. (23,24), para revisarla más detalladamente ver Arango-Davila y cols, 2002 (25). Bajo microscopio quirúrgico se realiza una incisión longitudinal en la línea media del cuello. Se localizan y disecan la arteria carótida común (ACC) y la arteria carótida externa (ACE), la cual se secciona, quedando así libre la ACE y ligada en su extremo. Un segmento de nylon monofilamento 4-0 de 3.5 cm se introduce por el extremo del fondo de saco correspondiente a la ACE hasta una longitud de 17.5 mm y se fija. Al cabo de 90 minutos se hala el nylon a través de la herida quirúrgica y se deja alojado su extremo en el fondo de saco de la ACE, de esta forma se inicia la reperfusión. A los dos especímenes que se dejan como controles se les realiza todo el procedimiento descrito a excepción de que el nylon monofilamento 4-0 no se introduce hasta el nivel de la ACM. Las 18 ratas intervenidas se distribuyen en grupos y son sacrificadas a las 3 horas, 12 horas, 24 horas y 72 horas.

Al tiempo correspondiente las ratas de cada grupo fueron anestesiadas y perfundidas por vía transcardiaca a través del ventrículo izquierdo con 200 ml de solución salina al 0.9% seguido de 200 ml de una mezcla de paraformaldehído (4.0%), lisina y periodato de sodio en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.4). Seguidamente los cerebros se retiraron de la caja craneal y se dejaron en el fijador para después practicarles 10 cortes coronales de un espesor de 30µm en el vibrátomo de medio líquido, estos cortes se realizaron de acuerdo con las coordenadas del

Atlas de Paxinos y Watson (1986) de forma secuencial anteroposterior partiendo del punto interaural 10.7 con bregma 1.7, cada milímetro hasta el punto interaural 3.7 con bregma -5.3.

Histología

Los cortes fueron procesados con coloración de hematoxilina-eosina corriente y azul de toluidina. Igual número de cortes fueron fijados en formol y se lavaron con agua destilada para ser teñidos con hematoxilina de Harris durante tres minutos. Los cortes coronales de un cerebro de cada uno de los grupos con hematoxilina de Harris, fueron fotografiados en su aspecto panorámico con cámara digital (Ezcam II ICM532A) y transferidos al programa de procesamiento de imágenes Photolimpact SE versión 3.02 y Photolimpact Viewer versión 3.02. El cálculo morfométrico del área del infarto se determina midiendo en cada corte coronal el área total y el área infartada, se determina así el porcentaje de área lesionada con relación al total del área del corte (22).

Inmunohistoquímica

Se utilizaron anticuerpos primarios anti-MAP-2 (Monoclonal anti-MAP-2 1:100 Santacruz Technology) para marcar el citoesqueleto neuronal, anti-GFAP (Monoclonal anti-GFAP 1:500 Boehringer-Mannheim) para marcar el citoesqueleto glial, anti-MHC (Monoclonal anti-MHC 1:300 Santacruz Technology) para marcar células de la microglía y anti-caspasa 3 (Monoclonal anti-caspasa 3 1:300 Cell Signaling Technology) para evaluar la activación de esta proteasa.

Los cortes de 30µm hechos en el vibrátomo se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente por 24 horas, después se lavaron en buffer fosfato 10mM (pH 7.4) y se hicieron reaccionar con el anticuerpo secundario utilizando el kit de avidina biotina (vectastain) para ser revelados utilizando diamino benzidina contrastado con níquel (ABC kit vector laboratories). Las muestras seleccionadas como controles tuvieron el mismo procedimiento, excepto la incubación con el anticuerpo primario.

RESULTADOS

De las 22 ratas intervenidas murieron 4 durante las primeras 6 horas después de la cirugía, dos de ellas presentaron hemorragia subaracnoidea, la causa de muerte de las otras dos no se pudo determinar, la tasa global de mortalidad por el procedimiento fue del 19%. En nuestra serie la presencia de lesión como consecuencia del procedimiento quirúrgico se presentó en 100% de los especímenes.

Anatomía patológica e histopatología

El hallazgo histológico con hematoxilina-eosina y azul de toluidina en las áreas lesionadas consiste en alteración

de la morfología celular que incluye tumefacción celular, eosinofilia citoplasmática, picnosis nuclear, cariólisis y cariorrexis (Figura 1A y 1B). En los sectores más comprometidos áreas necróticas basófilas con espacios “vacíos” que consisten en la denominada necrosis colicuvativa del tejido nervioso (Figura 1C).

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina de Harris muestran la tendencia evolutiva del infarto. Con el transcurso de las horas el tamaño del infarto crece y a las 12 horas la lesión es grande y cavitada perdiéndose la anatomía normal (Figura 2). A las tres horas de isquemia la evidencia anatomopatológica no es homogénea entre todos los especímenes; dos de los cuatro cerebros de las muestras experimentales no muestra signos macroscópicos de necrosis pero si se evidencia eosinofilia citoplasmática

FIGURA 1. A, neuronas de apariencia morfológica normal de sectores corticales no isquémicos teñidas con azul de toluidina. B, Borde del foco isquémico tres horas después de la lesión, pérdida de la morfología celular por edema intracelular (azul de toluidina). A las doce horas se observa en C con hematoxilina eosina cavitación por lisis celular, núcleos picnóticos y cariólisis (Barra=250 μ m).

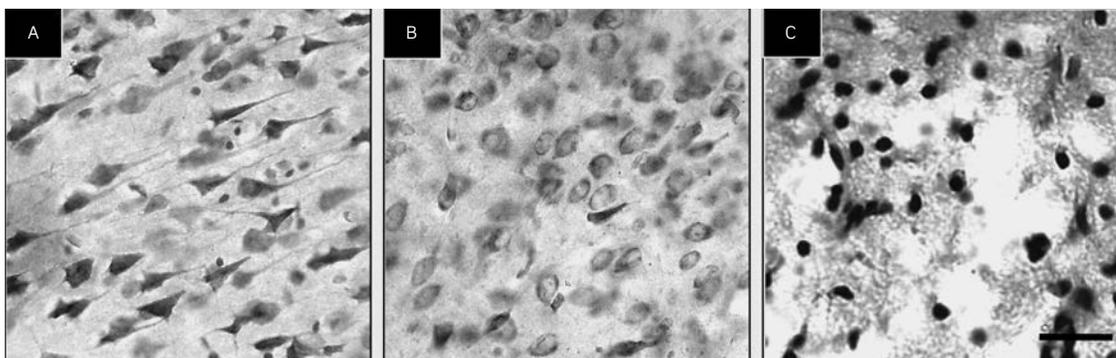
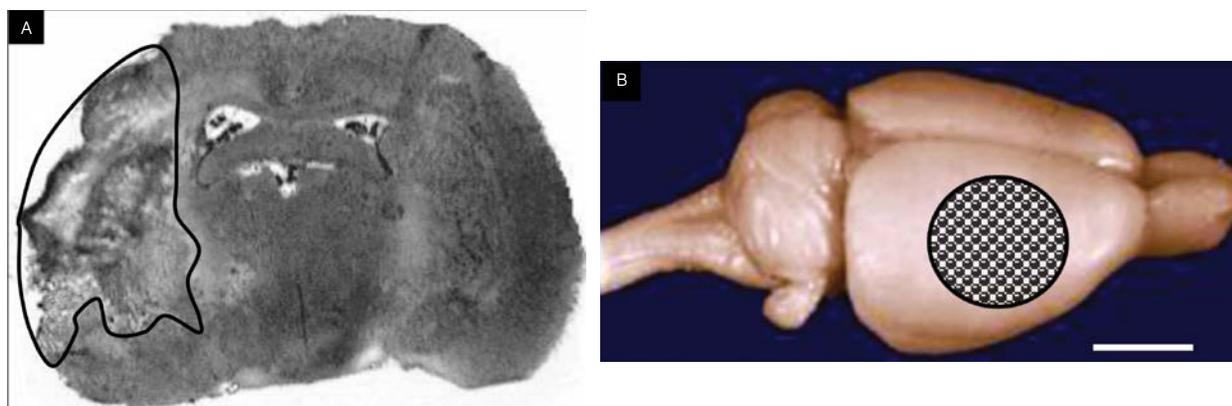


FIGURA 2. A, corte coronal de cerebro de rata en el que se observa el foco necrótico después de 12 horas de lesión isquémica del territorio de la ACM (Barra=0,4 mm). B, composición en la que se resalta el área comprometida en la superficie dorsolateral del cerebro que se corresponde con la corteza frontoparietal (Barra=1,6 mm).



y picnosis nuclear en corteza cerebral y caudatoputamen, un cerebro muestra claras lesiones macroscópicas en el sector dorsolateral del caudatoputamen y en el hipocampo, sin daño macroscópico de la corteza, los restantes especímenes presentan lesión tanto en corteza como en caudatoputamen. A partir de las 12 horas la lesión tiende a ser muy parecida en los diferentes especímenes con lesión de corteza y caudatoputamen, de las doce a las 24 horas el tamaño del infarto crece entre 1 y 1,5 mm² desde su borde mientras que entre las 24 y las 72 horas el cambio en el tamaño no es significativamente importante, permanece estable.

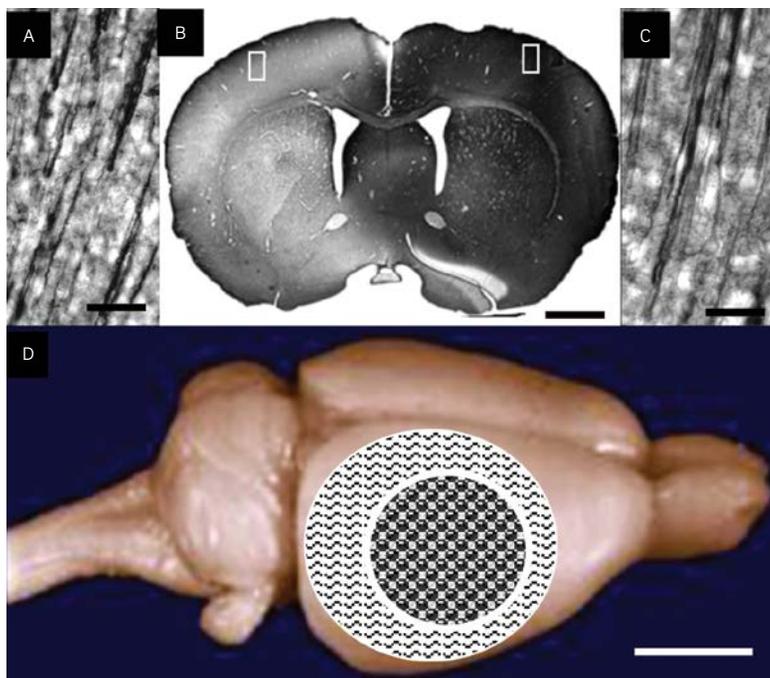
Los especímenes con 12 horas de supervivencia presentaron necrosis colicuativa en un área proporcional al corte coronal de 30.8 ± 6.25%, los especímenes con 24 horas de supervivencia la presentaron en un área total de 39.4 ± 2.4% y los especímenes con 72 horas de supervivencia en un área correspondiente al 40.1 ± 1.89% del total del corte coronal. No es significativa la diferencia de las áreas lesionadas de los grupos con 24 y 72 horas lo que

implica que a las 24 horas ya está definido el tamaño de la lesión. En esta serie se procesaron 6 cerebros completos con 8 cortes cada uno para evaluación volumétrica, se observa una importante homogeneidad en los diferentes especímenes a las 24 y 72 horas, en estos tiempos el promedio del volumen fue de 165.2 ± 22 mm³.

Reacción del citoesqueleto neuronal

Tres animales de cada grupo con períodos de supervivencia de 3, 12, 24 y 72 horas se procesaron para estudio inmunohistoquímico con anti-MAP-2. A las 3 horas en el área adyacente al infarto de la corteza cerebral ipsilateral, se observa una clara disminución del número de células inmunoreactivas y de la densidad de la reacción, con fragmentación y desaparición de microtúbulos. Estos cambios son más claros en las dendritas de células piramidales de las láminas III y V con amputación de sus dendritas apicales y reducción de las dendritas basales y de la reacción perinuclear (Figura 3).

FIGURA 3. Isquemia cerebral experimental en el territorio de la arteria cerebral media en rata. A, B, C, Inmunohistoquímica para MAP2 que permite observar los microtúbulos de las neuronas a las 3 horas después de la isquemia. B, corte coronal del cerebro, se observa en el hemisferio derecho una amplia área pálida que corresponde a cambios de los microtúbulos (Barra=0.4 mm). A, fragmentación microtubular de dendritas apicales de neuronas piramidales de la corteza cerebral y C, microtúbulos indemnes en la corteza no lesionada (Barra=25 μm) D, composición en la que se muestra la extensión del compromiso de los microtúbulos, más allá del foco, esta zona corresponde al área de penumbra (ver texto) (Barra=1,6 mm).



La disminución de la inmunoreactividad a la MAP-2 es muy clara desde las tres horas (Figura 3), adyacente al foco isquémico pero en una amplia extensión de tal manera que compromete una parte importante de la corteza, la totalidad del cuerpo estriado y el hipocampo; a las 72 horas la extensión de esta área se ha disminuido significativamente y corresponde a un margen que rodea el foco isquémico.

Reacción de la macroglía y la microglía

En todas las muestras evaluadas se observa a las 3, 12, 24 y 72 horas una importante reacción de los astrocitos notable en toda la extensión de la corteza cerebral ipsilateral a la lesión. Los astrocitos reactivos se caracterizan morfológicamente por un aumento en el tamaño (hipertrofia) y un incremento en el número y extensión de sus procesos (Figura 4).

La reacción de la microglía se observa desde las doce horas de isquemia, pero es más notable a las 24 horas,

se comprueba por la presencia de microglía activa y microglía reactiva (Figura 5A). La proporción de estas células es mayor en cuanto más cerca se encuentre el foco isquémico y disminuyen paulatinamente al aproximarse al tejido sano. En el sector necrótico y en el borde de la lesión se observa principalmente microglía reactiva con su típica constitución esférica y pequeña (Figura 5B) la cual desempeña su función fagocitaria; cerca al borde de la lesión se observa microglía activa con su cuerpo celular abultado y sus prolongaciones gruesas y cortas (Figura 5C) intercaladas con estas pero en mayor proporción al alejarse del infarto se observan células de microglía en reposo con prolongaciones delgadas, citoplasma y núcleo estrecho (Figura 5D).

Activación de proteasas

Se observa inmunoreactividad a la caspasa 3 en toda la extensión del foco isquémico, en el borde del foco se pueden observar células con morfología piramidal caspasa

FIGURA 4. Isquemia cerebral experimental en el territorio de la arteria cerebral media en rata. A, B, C, Inmunohistoquímica para GFAP que permite observar los astrocitos a las 12 horas después de la isquemia. B, Panorámica de la reacción glial. Se puede comparar la inmunoreactividad a la GFAP en el sector CA1 derecho del hipocampo (flecha) con el lado contrario (Barra=250 μ m). A, Astrocitos reactivos, nótese la hipertrofia del soma y el incremento en el número y extensión de los procesos al compararlos con la corteza contralateral (C) (Barra=25 μ m). D, composición en la que se muestra la extensión de la reacción astrocitaria en todo el hemisferio (Barra=1,6 mm).

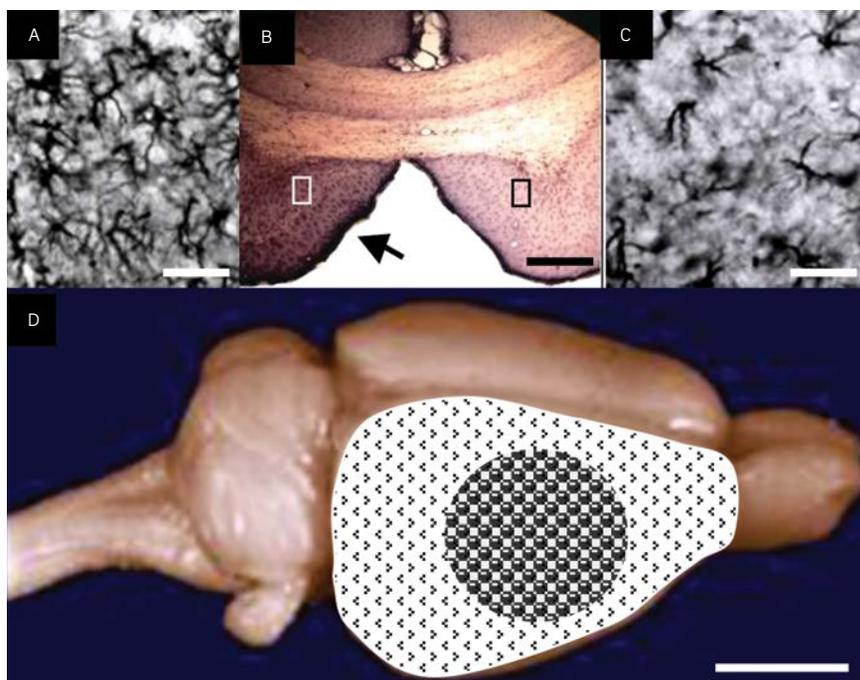
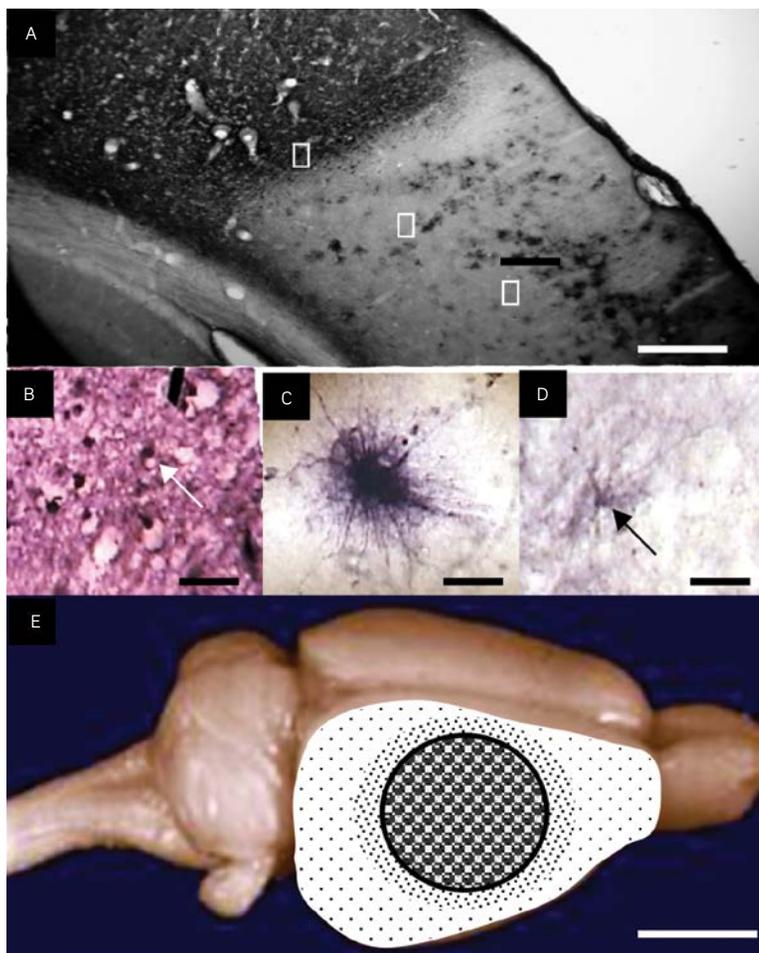


FIGURA 5. Isquemia cerebral experimental en el territorio de la arteria cerebral media en rata. B, C, D, inmunohistoquímica para MHC que permite observar las células de la microglía a las 12 horas después de la isquemia. A, panorámica del borde de la lesión (Barra=0.8 mm), se marcan con cuadrados las áreas correspondientes a las microfotografías abajo. B, microglía reactiva que se observa en el foco isquémico, morfología irregular típica de células fagocíticas (Barra=25 μ m). C, microglía activa que se observa bordeando el foco isquémico (Barra=10 μ m). D, microglía de reposo lejos del foco isquémico (Barra=10 μ m). E, composición en la que se muestra la distribución de los inmunofenotipos de las células de microglía; en el foco la microglía reactiva, bordeando el foco (puntos densos) microglía activa y en la extensión del hemisferio microglía de reposo (puntos espaciados) (Barra=1,6 mm).



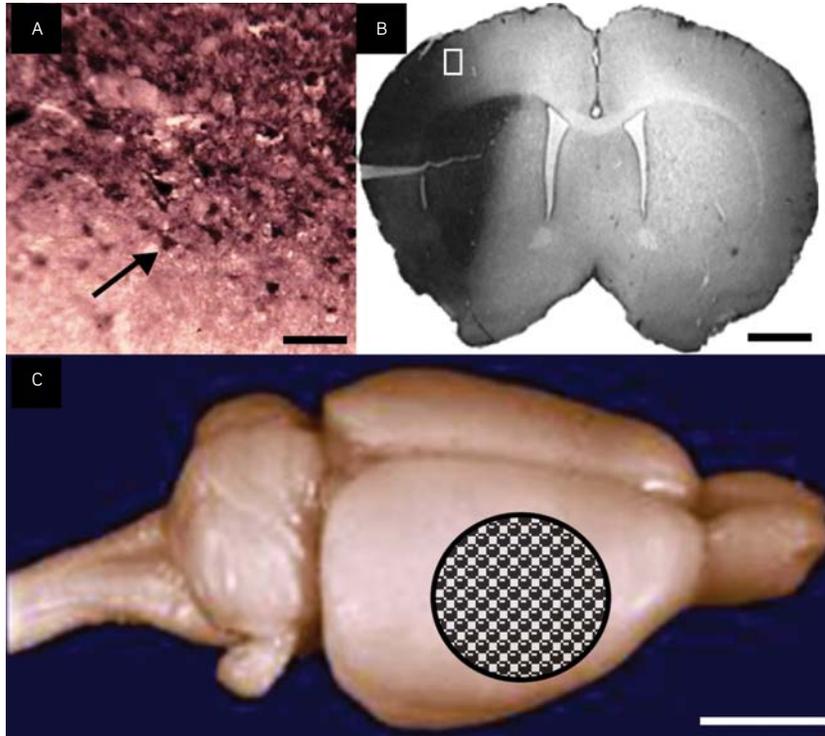
positivas, no se observan células de otras características morfológicas que presenten esta reacción (Figura 6). La reactividad a las caspasas se presenta desde las tres horas postisquemia y en todos los tiempos se encuentra limitada al foco isquémico, a las 72 horas se observa disminución importante de neuronas caspasa positiva en el borde de la lesión.

DISCUSIÓN

Los modelos de isquemia cerebral focal transitoria en ratas por obstrucción de la ACM con sutura intraluminal

han adquirido en los últimos tiempos importancia para el estudio de los fenómenos subyacente al insulto isquémico, especialmente por su similitud con la lesión humana (4,5,26-28). La observación de la anatomopatología y la histopatología del modelo de isquemia cerebral focal experimental en ratas, no se aleja de las descripciones clásicas de la muerte celular necrótica en el cerebro humano (2). En esta serie experimental se observa desde las tres horas la alteración isquémica: neuronas rojas, edema celular, picnosis nuclear, desplazamiento del núcleo a la periferia del cuerpo celular, ruptura de la membrana nuclear y cariólisis, con el transcurso de

FIGURA 6. Isquemia cerebral experimental en el territorio de la arteria cerebral media en rata. A, B, Inmunohistoquímica para caspasa 3 activada a las 3 horas después de la isquemia. A, Neuronas piramidales positivas para caspasa 3 (Barra=10 μ m), las cuales se observan al borde del foco isquémico en la panorámica B (Barra=0.4 mm). C, composición en la que se muestra que la activación de caspasa 3 esta en relación con el borde y el foco isquémico (Barra=1,6 mm).



las horas el tejido se licua y se genera la denominada necrosis colicuvativa. El tamaño de la lesión crece con el transcurso del tiempo y de forma significativa hasta las 24 horas de isquemia, después de este tiempo el tamaño tiende a estabilizarse.

En nuestra serie dos ratas del Grupo B (12 horas de supervivencia postisquemia) muestran necrosis colicuvativa en el caudatoputamen sin compromiso macroscópico de la corteza. Estos resultados son congruentes con los encontrados por algunos autores quienes consideran que los mecanismos fisiopatológicos de la lesión cortical y la lesión del estriado son diferentes, se señala por lo tanto una mayor vulnerabilidad de los ganglios basales a la isquemia y una evolución diferente en el proceso de reparación (29,30).

La MAP-2 muestra cambios inmunoreactivos ante la isquemia pero estos cambios no necesariamente implican la muerte neuronal (31,32), la activación de diferentes proteínquinasa durante la isquemia tiene relación con

los fenómenos de fosforilación de las proteínas del citoesqueleto y por lo tanto con la degradación de los microtúbulos (33). Nuestra observación indica disminución de la inmunoreactividad de la MAP-2 en corteza cerebral, caudatoputamen e hipocampo a las 3 horas después de la isquemia; este hecho ha sido sistemáticamente descrito por diferentes autores (34,35).

Los cambios en el ensamblaje de microtúbulos y en la inmunoreactividad de la MAP-2 son un importante y sensible indicador de respuesta neuronal al insulto isquémico y al estrés metabólico celular (36-39). Muchas vías mediadas por diferentes mensajeros intracelulares incrementan la fosforilación de la MAP-2, lo que ocasiona disminución del ensamblaje microtubular, que se expresa en los preparados inmunohistoquímicos como áreas que no captan el anticuerpo (Figura 3). Esta manifestación inmunohistoquímica es marcadamente sensible a los cambios metabólicos que se dan no solo en el foco isquémico sino en sectores contiguos más alejados como la totalidad

del estriado y el hipocampo; varios autores han considerado que estas dos estructuras corresponden a zona de penumbra asociada al territorio de la ACM (38-43).

La disminución de la inmunoreactividad de la MAP-2 en las primeras horas después de la isquemia tiende a recuperarse con el paso de los días, se considera que estos cambios se relacionan con mecanismos compensatorios de plasticidad cerebral: inicialmente implica una disminución de los patrones de conectividad y posteriormente fenómenos de reorganización y redireccionamiento de los contactos sinápticos (41,43). Esta posibilidad de revertir implica que la modificación del inmunofenotipo de la MAP-2 no necesariamente corresponde a muerte celular. La marcación de la MAP-2 es una clara evidencia de lesión cerebral no letal y es significativa porque muchos de los fenómenos bioquímicos desencadenados por la excitotoxicidad y el estrés anóxico confluyen en la expresión de la MAP-2.

Partiendo de estas observaciones, se puede plantear, que la gran sensibilidad de la MAP-2 al estrés metabólico en la periferia del foco isquémico que incluye el caudatoputamen, el hipocampo y la corteza cerebral adyacente se puede correlacionar con la denominada zona de penumbra isquémica (44). Según estas observaciones, la zona de penumbra isquémica se establece desde muy temprano después de que se instaura la lesión, como se pudo observar a las 3 horas postisquemia (Figura 3). Con el transcurso de las horas, parches de tejido isquémico se fusionan para establecer de esta manera el foco isquémico en las áreas de ausencia total de irrigación (Figura 2). El foco isquémico definitivo es más pequeño que el área demarcada por la baja inmunoreactividad a la MAP-2, lo que implica un proceso de adaptación vascular de las áreas más periféricas de la penumbra y posiblemente un fenómeno de preacondicionamiento celular.

Con relación a la microglía la isquemia cerebral focal ocasiona una bien conocida respuesta de activación de los astrocitos no solo en el sector focal y área de penumbra, sino también, en sectores alejados del foco isquémico (45) como lo hemos podido observar en toda la extensión del hemisferio lesionado a las 12, 24 y 72 horas con la marcación del citoesqueleto del astrocito con anti-GFAP (Figura 4). El incremento de la inmunoreactividad de la

proteína GFAP que corresponde a un tipo de filamento intermedio específico de los astrocitos se ha establecido como uno de los marcadores más sensibles para observar la reacción astrocitaria (46).

Se ha descrito que después de la isquemia se incrementa significativamente la recaptura de glutamato por los astrocitos y se aumenta la síntesis, la concentración y la actividad de la glutamina sintetasa (47,48) enzima que transforma el glutamato en glutamina. Sin embargo, los astrocitos que se encuentran al borde de la lesión en progreso, captan importantes cantidades de glutamato liberado durante el proceso isquémico pero en el momento en que los astrocitos presentan falla energética por la ausencia de irrigación sanguínea, se despolarizan y edematizan liberando de forma súbita al espacio intersticial todo el glutamato absorbido, de esta manera empeoran la excitotoxicidad y aportan al crecimiento del foco isquémico (49).

A pesar de esto, los astrocitos localizados en áreas de penumbra y áreas de normalidad metabólica forman un sincitio activo que se constituye en un buffer espacial de potasio, por lo tanto hay un traslado de potasio del sitio donde se encuentra en altas concentraciones a otros alejados de estas áreas, y de esta manera se controla en parte la hiperexcitabilidad neuronal en el área de penumbra. La activación del sincitio astrocitario tiene muchas otras consecuencias importantes: fomenta o inhibe el crecimiento axonal, posibilita el redireccionamiento del cono axonal, sintetiza y libera sustancias neurotróficas (45) y en general hacen posible la reparación de las lesiones (48,49).

El sistema nervioso cuenta con un contingente de células derivadas del mesodermo embrionario las cuales en etapas tempranas del desarrollo emigran al SNC y ejercen una función inmunomoduladora. En nuestra serie observamos cambios de las células de la microglía a las 12, 24 y 72 horas después de la isquemia al marcarlas con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (18), reportamos diferentes tipos de inmunofenotipos microgliales dependiendo de la cercanía al foco isquémico (Figura 5B, 5C y 5D). En el foco y el borde se observa microglía activa con su típica apariencia de célula fagocítica; se ha descrito que durante las primeras horas después del

desencadenamiento de la excitotoxicidad la microglía puede facilitar la muerte y la destrucción de las células nerviosas por la liberación de agentes como el factor de necrosis tumoral alfa, el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno y los aniones superóxido. Este fenómeno aunado a la falla energética de los astrocitos en el borde de la lesión descrita previamente, potencia localmente la muerte celular y el crecimiento del foco isquémico.

Adyacente al foco se observa la microglía activa (Figura 5C), la cual en su extensión se acopla con el área de penumbra demarcada con MAP-2. Los cambios dados por la falla energética subletal del área de penumbra son los responsables de la modificación de estas células que se consideran inmunomoduladoras (18), en la medida que el foco crece las células de la microglía reactiva adyacentes recogen totalmente sus procesos, se contraen y se transforman en células activas fagocitarias. El papel de la microglía en las lesiones isquémicas del sistema nervioso depende del estado y grado de resolución de la lesión, en este proceso, la microglía puede fomentar la sobrevivencia de las células y la reparación de los tejidos por la síntesis de factores de crecimiento como las interleukinas 1 y 3 y los factores de crecimiento celular que estimulan la astrogliosis y la sobrevivencia neuronal (50).

La serie desarrollada por nosotros muestra neuronas piramidales caspasa 3 positivas especialmente a las 3 y 12 horas localizadas en el borde de la lesión (Figura 6A). Se reporta que esta activación de caspasa 3 en el foco isquémico no corresponde al desencadenamiento de mecanismos apoptóticos, sino a la liberación del citocromo c de las mitocondrias al citoplasma como consecuencia de la falla energética aguda (21).

La activación de la caspasa 3 en relación con las neuronas piramidales que se encuentran en el límite del foco isquémico puede interpretarse como un indicador temprano de actividad excitotóxica, progresiva e irreversible. Si bien, en la muerte celular necrótica se activan diferentes tipos de proteasas debido especialmente al incremento masivo de calcio intracelular, estas proteasas en las que se incluyen las caspasas tienen la capacidad de digerir muchos tipos de proteínas (21). El hecho de que se pueda detectar la caspasa 3 activada indica que el proceso proteolítico masivo no se ha desencadenado

en su totalidad; la activación de la caspasa 3 tendría más relación con la falla energética mitocondrial que conllevaría a la liberación del citocromo c, el cual posibilita la formación del complejo citocromo c-proteína proapoptótica BAD-Apaf. En este caso, la formación de este complejo y el resultado de la activación de la caspasa 3 se puede interpretar como indicador temprano de muerte necrótica y de actividad progresiva excitotóxica; esto es congruente con el hecho de que las neuronas piramidales caspasa 3 positivas en nuestra serie se observan especialmente entre las 3 y las 12 horas postisquemia; a las 72 horas el proceso excitotóxico se encuentra culminado y a este tiempo no se observan neuronas caspasas positivas. Es llamativo que la morfología de las células caspasa 3 positivas, corresponda exclusivamente a neuronas piramidales; no se observan astrocitos ni células de microglía marcadas para caspasa 3, esto indica procesos de activación de proteasas diferentes relacionados con las características de las células sometidas a la isquemia.

CONCLUSIONES

La formación del foco isquémico, la activación de la proteasa caspasa 3, la desarticulación de los microtúbulos de las neuronas, la activación de los astrocitos y los cambios del inmunofenotipo de la microglía; forman en su contexto un mapa integrado de fenómenos que puede dar luces sobre la reacción del tejido nervioso y sus procesos de reorganización. La Figura 7 es una composición en la que se muestra especialmente el conjunto de cambios que se dan durante las primeras 12 horas después de instaurarse una isquemia cerebral, estos fenómenos más relevantes permiten proponer cuatro eventos fisiopatológicos delimitados, los cuales están fundamentados en nuestros resultados con la técnica inmunohistoquímica, el seguimiento temporal y la histopatología básica (Figura 8):

ZONA DE FOCO ISQUÉMICO: sitio en el cual no hay actividad metabólica y se observa claramente el fenómeno necrótico. Se caracteriza por la pérdida total de la estructura tisular, licuefacción y formación de espacios con detritos celulares, los cuales se reabsorben después, generando con frecuencia quistes compuestos de líquido cefalorraquídeo delimitados por la cicatriz glial, barrera

FIGURA 7. Composición en la que se muestra la simultaneidad de eventos celulares 12 horas después de presentarse lesión por isquemia cerebral focal

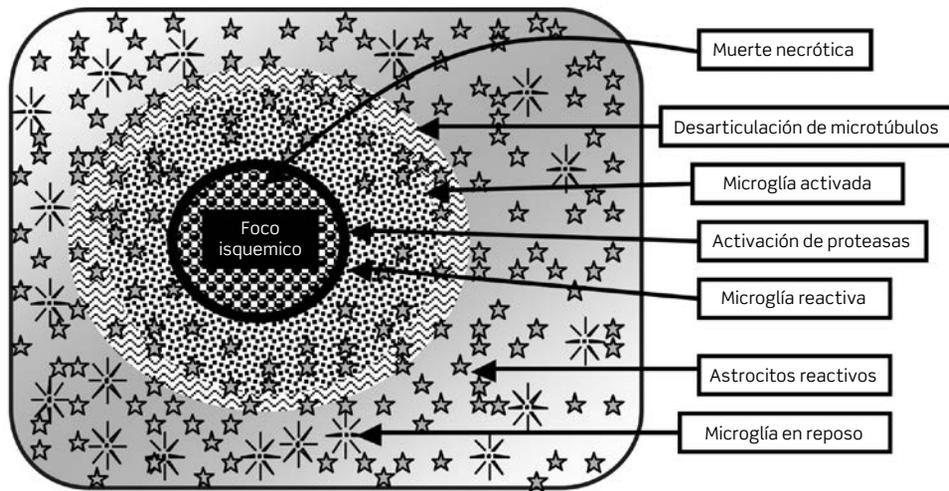
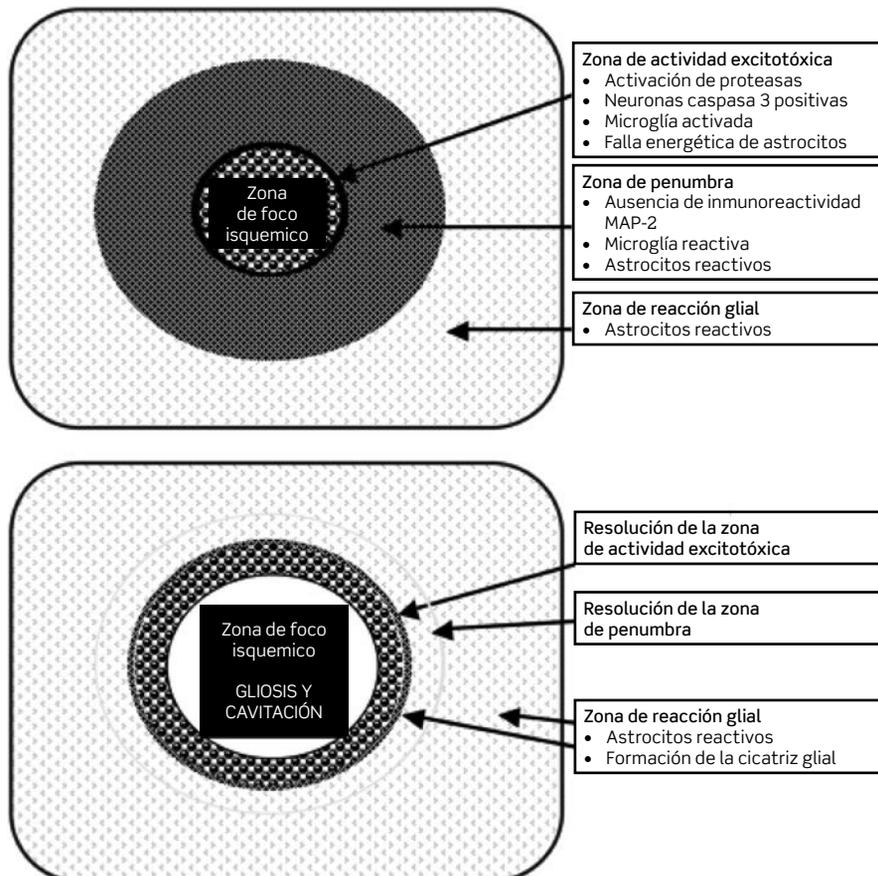


FIGURA 8. Síntesis de los fenómenos fisiopatológicos tisulares a las 12 horas (arriba) y 72 horas (abajo) después de una isquemia cerebral focal. El área de penumbra se delimita desde el inicio de la isquemia y el foco crece sin invadir completamente esta zona. A las 72 horas se resuelve la zona de actividad excitotóxica y también la parte más externa de la zona de penumbra. La reactividad astrocitaria dura varios días, tiempo en el cual se instaura la zona de gliosis y con frecuencia queda una cavidad de características quísticas compuesta de líquido cefalorraquídeo



que aísla el sistema nervioso del entorno y facilita el restablecimiento del ambiente neuronal. El foco isquémico aumenta de tamaño de forma importante durante las primeras 12 horas.

ZONA DE ACTIVIDAD EXCITOTÓXICA: caracteriza por la activación en las neuronas de la proteasa de cisteína caspasa 3 y otras proteasas desde los primeros momentos, al parecer por falla metabólica mitocondrial. La activación de esta proteasa al borde de la lesión es indicio de irreversibilidad pero no implica el fenómeno necrótico en su plenitud, pues la activación de otras proteasas durante la muerte isquémica destruye la caspasa 3. En esta zona también se observan células de microglía activadas las cuales asumen un comportamiento fagocítico y liberan citoquinas proinflamatorias, óxidos nítricos y radicales libres. Por otro lado, los astrocitos de esta zona, igual que otras células, entran en falla energética y muerte aguda por lo cual liberan el glutamato, el calcio y el potasio asimilados durante la isquemia. Los anteriores tres fenómenos en su conjunto hacen que el foco crezca y que la lesión empeore. La zona de actividad excitotóxica se resuelve completamente después de las 24 horas.

ZONA DE PENUMBRA: en este trabajo se propone que la disminución de la inmunoreactividad de la MAP-2 delimita el área de penumbra isquémica. En ésta zona se observan también células de microglía reactivas las cuales normalmente responden a los cambios del microambiente por la alteración metabólica que se da en el tejido en el cual se encuentran inmersas. Esta zona es invadida paulatinamente por el crecimiento del foco isquémico pero no es abarcada en su totalidad, normalmente la zona más periférica recupera su estabilidad fisiológica

y la inmunoreactividad de la MAP-2 se restablece, igual la microglía reactiva desaparece. La reacción astrogliol persiste hasta las 72 horas.

ZONA DE REACCIÓN GLIAL: en esta zona que se encuentra externa al área de penumbra, no hay cambios notables de la inmunoreactividad a la MAP-2 y no se observa microglía activa. Se caracteriza por presentar astrocitos reactivos los cuales se observan varios días después de la isquemia y se amplía en la medida en que se resuelve la zona de excitotoxicidad y la zona de penumbra.

El mapeo de los diferentes compartimientos celulares del tejido permite ampliar el entendimiento de los fenómenos fisiopatológicos subyacentes a la lesión isquémica y se puede establecer como modelo de evaluación *in vivo* de intervenciones farmacológicas dirigidas a la neuroprotección, en los cuales, se puede establecer la repercusión de las estrategias terapéuticas sobre el conjunto de la glía, la microglía, las neuronas o la zona de actividad excitotóxica.

AGRADECIMIENTOS

Al señor Alberto Arango Davila (QEPD) por su apoyo logístico y técnico. La financiación para la culminación de este trabajo fue aportada por la Fundación Valle del Lili y la Universidad Icesi.

DECLARACION DE CONFLICTOS DE INTERES

El autor manifiesta no tener ningún conflicto de interés en la presentación de este trabajo.

REFERENCIAS

1. White B, Sullivan J, DeGracia D, Oneil B, Neumar R, Grossman L, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of neurological sciences* 2000;179:1-33.
2. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. *ROBBINS Patología Humana*. 8va ed. Barcelona, España: Elsevier Saunders; 2008.
3. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra - Revision of a concept. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 1998;18:621-38.
4. Cardona-Gomez GP, Arango-Davila CA, Gallego-Gomez JC, Barrera-Ocampo A, Pimienta H, Garcia-Segura LM. Estrogen dissociates Tau and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit in postischemic hippocampus. *Neuroreport*. 2006;17(12):1337-41.

5. Garcia-Galloway E, Arango-Davila CA, Pons S, Torres-Aleman I. Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003;24(4):1027-37.
6. Ginsberg MD. Current Status of Neuroprotection for Cerebral Ischemia. Synoptic Overview. *Stroke*. 2009;40(suppl 1):S111 - S4.
7. Drewes G, Ebneth A, Mandelkow E. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci*. 1998;23:307-11.
8. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998;279:509-14.
9. Small J, Rottner K, Kaverina I. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:54-60.
10. Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Current Opinion in Cell Biology*. 2010;22:104-11.
11. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*. 1999;79(4):1431-568.
12. Hawkins T, Mirigian M, Yasar MS, Ross JL. Mechanics of microtubules. *Journal of Biomechanics*. 2010;43:23-30.
13. Wiche G, Oberkanins C, Himmler A. Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol*. 1991;124:217-73.
14. Mandelkow E, Mandelkow E. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:72-81.
15. Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*. 2000;61:133-68.
16. Sim A. The regulation and function of protein phosphatases in the brain. *Mol Neurobiol*. 1992;5:229-46.
17. Goldberg Y. Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol* 1999(57):321-8.
18. Finsen B, Jorgensen M, Diemer N, Zimmer J. Microglial MHC antigen expresión after ischemic and kainic acid lesion of the adult rat hippocampus. *Glia*. 1993;7:41-9.
19. Banasiak K, Xia Y, Haddad G. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology*. 2000;62(3):215-49.
20. Rami A, Agarwal R, Botez G, Winckler J. μ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Research*. 2000;866(1-2):299-312.
21. Tetsumori Y. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in Neurobiology*. 2000;62(3):273-95.
22. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
23. Belayev L, Zhao W, Ginsberg D. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: I. three dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1266-80.
24. Belayev L, Zhao W, Ginsberg D. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: II: Neurological deficit, pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1281-90.
25. Arango CA, Escobar M, Pimienta H. Evaluation of a Model of Cerebral Ischemia in Rats. *Salud UIS*. 2002;34(3):195-201.
26. Leach M, Swam J, Eisenthal D, Dopson M, Nobbs M. BW619C89 a glutamate release inhibitor, protects against focal cerebral ischemic damage. *Stroke*. 1993;24:1063-7.
27. Osborne K, Shigeno T, Balarsky A, Ford I, McCulloch J, Teasdale G, et al. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of cerebral ischaemia. *J of Neurol Neuropshy and Psychiatry*. 1987;50:402-10.
28. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat by Intraluminal Suture. Neurological and Pathological Evaluation of an Improved Model Stroke. 1996;27:1616-23.
29. Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, Miyake Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke*. 1995;26:1655-8.
30. Dereski M, Chopp M, Knight R, Rodolosi R, Gracia J. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. *Acta neuropathologica*. 1993;85:327-33.
31. Postmantur R, Kampel B, Liu S, Heck K, Taft W, Cifton G, et al. Cytoskeletal derangements of cortical neuronal processes three hours after traumatic brain injury in rats: an immunofluorescence study. *J Neuropathol and exp neurol*. 1996;55:68-80.
32. Saito N, Kawai K, Nowak T. Reexpression of developmentally regulates MAP2c mRNA after ischemia: colocalization with hsp72 mRNA in vulnerable neurons. *J Cereb Blood Flow and Metab*. 1995;15:205-15.

33. Toyama Y, Sako K, Yonemasu Y. Protein kinase C in focal ischemic rat brain : dual autoradiographic analysis of [¹⁴C]iodontipyrine (IAP) and [³H]phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu). *Brain Res.* 1997;750:155-60.
34. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Micoshiba K, Hata R, Ueda H, et al. Microtubule-associated protein 2 a sensitive marker for cerebral ischemic damage, immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience.* 1989;31:401-11.
35. Miyazawa T, Bonnekoh P, Hossmann K. Temperature effect of immunostaining of Microtubule-associated protein 2 and synaptophysin after 30 minutes of forebrain ischemia in rat. *Acta Neuropathol.* 1991;85:526-32.
36. Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in Neurobiology* 2000;62:273-95.
37. Minger S, Geddes J, Holtz M, Craddock S, Sidney W, Whiteheart S, et al. Glutamate receptor antagonists inhibit calpain-mediated cytoskeletal proteolysis in focal cerebral ischemia. *Brain Research.* 1998;810:181-99.
38. Pettigres L, Holtz M, Craddock S, Minger S, Hall N, Geddes J. Microtubular preteolysis in focal cerebral ischemia. *J cereb Blood Flow and Metabolism.* 2000;16:61189-202.
39. Li G, Farooque M, Lennmyr F, Holtz A, Olsson Y. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesion in CNS injury. *APMIS.* 2000;108:298-06.
40. Dewar D, Dawson D. Changes of cytoskeletal protein immunostaining in myelinating fiber tracts after focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neuropathol.* 1997;93:171-7.
41. Popa-Wagner A, Schröder E, Schmoll H, Walker LC, Kessler C. Upregulation of MAP1B and MAP2 in the Rat Brain After Middle Cerebral Artery Occlusion: Effect of Age. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:425-34.
42. Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 2000;40:599-636.
43. Li Y, Jiang N, Power C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule associated protein 2, growth-associated protein 43 and cyclin immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1998;29(9):1972-1980.
44. Heiss W, Graff R. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurobiol.* 1994;7:11-9.
45. Ramírez-Expósito M, Martínez-Martos J. Estructura y funciones de la microglía en el sistema nervioso central. Respuesta a procesos degenerativos. *Rev Neurol.* 1998;26:600-11.
46. Hatten M, Liem R, Shelanski M, Mason C. Astroglia in CNS injury. *Glia.* 1991;4:233-9.
47. Schiffer D, Giordana M, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 1986;374:110-8.
48. Witte O, Stoll G. Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity. *Adv Neurol.* 1997;73:207-27.
49. Jabbs R, Bekar L, Walz W. Reactive astrogliosis in the injured and postischemic brain. In: Totowa NJ, editor. *Cerebral Ischemia: molecular and cellular pathophysiology*: Humana Press Inc; 1999. p. 233-49.
50. Kondo Y. Activated and phagocytic microglia. In: Walz W, editor. *Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology*. Totowa NJ: Humana Press; 1999. p. 251-69.