

Cambios Exofocales en la Expresión de Parvoalbúmina Posterior a Isquemia Focal

Adriana Medina¹, Martha Escobar², César Augusto Arango³, Hernán Pimienta⁴

En el presente estudio se utilizó un modelo de obstrucción proximal de la arteria cerebral media para observar el comportamiento de la proteína atrapadora de calcio parvoalbúmina en isquemia focal. Previamente nuestro grupo demostró cambios en células piramidales comisurales y de proyección en zonas exofocales, es decir, por fuera de la influencia de la arteria ocluida. La parvoalbúmina se expresa en una subpoblación de interneuronas corticales que reciben contactos sinápticos glutamatérgicos de regiones corticales ipsi y contralaterales; por esta razón permitiría evaluar los efectos directos e indirectos de la injuria. Dado el papel de la parvoalbúmina en la homeostasis del calcio en condiciones normales y en casos de injuria se espera que su expresión esté alterada bajo esta condición. Se encontró que: 1. La expresión de parvoalbúmina está disminuida en el foco, en la penumbra y en regiones exofocales. 2. Estos cambios se inician a partir de las 12 horas postisquemia y se extienden hasta los 22 días. 3. Existen variaciones regionales en la respuesta de la parvoalbúmina a la isquemia; incremento en las capas supragranulares y disminución en las infragranulares. 4. También se encontraron cambios en hipocampo y en estructuras subcorticales. Los anteriores datos permiten sugerir que: 1. Factores como la conectividad con las zonas infartadas, pueden ser determinantes en el tipo de respuesta en la expresión de la parvoalbúmina. 2. Los cambios exofocales pueden representar estados funcionales distintos que se pueden asociar a la aparición de nuevos síntomas neurológicos a largo plazo. *Salud UIS 2002; 34:179-187*

Palabras Clave: Isquemia, Interneuronas, Parvoalbúmina, Exofocal

A model of middle cerebral artery occlusion was used to analyze the behavior of the calcium binding protein parvalbumin in focal ischemia. Previous reports from our group demonstrate that neurons with callosal and subcortical projections (pyramidal cells) showed changes that are not restricted to the core or penumbra zones, but also involves areas not supplied by the occluded artery. Parvalbumin is a specific marker for a subpopulation of interneurons in the cerebral cortex, and different types of neurons in other subcortical nuclei. In cortex, this cells participate in local circuits, and are connected by glutamatergic fibers coming from the ipsi and contralateral hemisphere. Thereby, are suitable to evaluate direct and indirect effects of injury. It has been proposed the role of this proteins as calcium buffers, so it can be expected that its expression may be altered in ischemia. Our findings are: 1. The expression of parvalbumin is diminished in the penumbra and exofocal regions. 2. This changes begin at 12 hours after ischemia and extended as far as 22 days. 3. In the cerebral cortex supragranular layers show enhance in the number of labeled cells, whereas this number decreased in the infragranular ones. This data suggests that 1. Changes in parvalbumin expression are not exclusively associated to direct injury. 2. Other factors like connectivity of the ischemic zones may be determinant in the parvalbumin expression behavior. 3. Exofocal changes may indicate different functional states that may contribute to the neurological symptoms that can not be explained only by the compromise of the ischemic region. *Salud UIS 2002; 34:179-187*

Key Words: Ischemia, Interneurons, Parvalbumin, Exofocal

INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral es un evento agudo cuyos efectos a corto y largo plazo pueden ser devastadores. Los pacientes que sobreviven a un accidente cerebro vascular isquémico pueden presentar una amplia variedad de síntomas neurológicos y psiquiátricos,

entre los que se encuentran los trastornos de la función motora, depresión, emocionalismo, apatía, Parkinsonismo, agresividad y demencia.^{1,2,3} Aún en pacientes en los cuales no es posible identificar un síndrome psiquiátrico específico, se ha reportado disminución de la autonomía y de la capacidad laboral varios años después del episodio isquémico.⁴ En la búsqueda de soluciones para esta problemática, en la actualidad se intenta identificar las bases fisiopatológicas de estos cambios, apoyándose en modelos de isquemia inducida o experimental, como el utilizado en el presente trabajo.⁵

La obstrucción temporal del flujo sanguíneo en un área del encéfalo desencadena una serie de eventos intra e intercelulares que contribuyen a la prolongación del

¹ Médico Cirujano, Candidato a Doctor en Ciencias Básicas Médicas

² Médico Psiquiatra, Candidato a Doctor en Ciencias Básicas Médicas

³ Profesor Titular, Investigadora Centro de Estudio Cerebrales

⁴ Profesor Titular, Director Centro de Estudios Cerebrales, Facultad de Salud, Universidad del Valle

Correspondencia: Centro de Estudios Cerebrales, Facultad de Salud, Universidad del Valle

Recibido Noviembre 20 de 2002, Aceptado Diciembre 28 de 2002

daño aún después de darse la reperfusión vascular. Se ha propuesto que estos cambios dependen de la actividad excesiva del sistema glutamatérgico, fenómeno conocido como excitotoxicidad.^{6,7,8} Los mecanismos de injuria excitotóxica implican la elevación exagerada y sostenida de los niveles de calcio intracelular, sea por el ingreso de este ión a través de los receptores ionotróficos de glutamato del tipo NMDA, por liberación de los depósitos intracelulares como consecuencia de la activación de receptores metabotróficos para glutamato del tipo m GLUR 1 y 5, o por activación de canales de calcio dependientes de voltaje.^{9,10,11}

Existe un grupo de proteínas atrapadoras de calcio distribuidas en amplios sectores de la corteza cerebral, el estriado, el tálamo, el complejo habenuar, el área septal y el hipocampo entre otros, sobre las cuales se discute su papel neuroprotector.^{12,13,14} Las neuronas que expresan estas proteínas comprenden interneuronas y células de proyección que participan en los circuitos córtico-estriado-pálido-tálamo-cortical, asociados a las funciones cognitiva, emocional y motora. A la parvalbúmina se le relaciona con el papel de tampón de calcio, limitando la actividad enzimática y osmótica de este ión en casos de injuria,^{15,16,17} sin embargo este papel ha sido recientemente cuestionado.

En el presente estudio pretendimos evaluar el comportamiento de la proteína atrapadora de calcio parvalbúmina, posterior a isquemia focal por oclusión de la arteria cerebral media, teniendo en cuenta que el curso temporal de los cambios puede estar relacionado con modificaciones morfofuncionales en aquellos cerebros sujetos a isquemia. Además se pretendió establecer si los posibles cambios en la expresión de la parvalbúmina se restringen al foco, a la penumbra o si regiones distantes a estos sectores están comprometidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar adultas con un peso entre 200 y 250 gramos, con disponibilidad de comida y agua ad libitum. Se seleccionaron 15 que mostraron evidencia clínica de compromiso neurológico de acuerdo a la escala de Zea Longa,¹⁸ en la cual grado 0, indica que no hay déficit neurológico; grado 1, no contrae la pata anterior izquierda completamente; grado 2, movimientos circulares a la izquierda; grado 3, inclinación permanente hacia el lado izquierdo con respuesta motora a estímulos y grado 4, nivel de conciencia deprimido sin respuesta motora a estímulos.

Procedimiento quirúrgico

La isquemia focal se produjo utilizando el modelo de oclusión intraluminal descrito previamente por Zea Longa.¹⁸ Brevemente, bajo anestesia general con una mezcla de ketamina (60mg/Kg) y atropina (0.1 mg/Kg), utilizando un microscopio quirúrgico se practicó una incisión en la línea media del cuello para exponer la arteria carótida común, seguidamente se disecaron y ligaron las arterias carótida externa e interna, posteriormente se ligó la arteria pterigopalatina cerca de su origen con una sutura 4-0. La isquemia se indujo introduciendo una sutura de nylon, monofilamento 4-0 (Ethilon, Ethilon Co, Inc.) a través de la arteria carótida externa y luego por una longitud de 18 mm a través de la arteria carótida interna hasta alcanzar el segmento inicial de la arteria cerebral media. Una sutura 5-0 se colocó alrededor de la arteria carótida externa para prevenir el sangrado. La incisión del cuello se cerró con una sutura 2-0. Después de 90 minutos de oclusión de la arteria cerebral media, se retiró la sutura para permitir la reperfusión. Los animales fueron sacrificados a las 12, 24 y 72 horas, 10 días y 22 días post isquemia.

Los procedimientos descritos fueron aprobados por el Comité de Ética para el Manejo de Animales Experimentales de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle.

Procedimiento Inmunohistoquímico

Los animales fueron sacrificados bajo anestesia general por perfusión intracardiaca, utilizando fijador PLP (paraformaldehído al 4%). Después de extraer el cerebro se dejaron en fijación por 48 horas. Luego se cortaron en secciones de 50 micras con un vibrátomo (Lancer). Las secciones se bloquearon durante 40 minutos en suero normal de cabra, y luego se lavaron en buffer fosfato salino (PBS, pH 7.5). Se incubaron durante toda la noche en el anticuerpo primario anti-parvalbúmina (Sigma, 1:5000) y al día siguiente después de lavarlas en buffer fosfato se incubaron en avidina-biotina (anti-mouse ABC kit, Vectastain) por 40 minutos, seguidamente las secciones se lavaron y finalmente se revelaron con diaminobenzidina contrastado con níquel. Las secciones de los animales control se procesaron de la misma manera, sin incubar en el anticuerpo primario.

RESULTADOS

Corteza cerebral

Aspecto normal células positivas para parvalbúmina

Considerando la heterogeneidad propia de la corteza cerebral y las variantes regionales en la población de interneuronas que expresan parvalbúmina, escogimos para

el análisis histoquímico secciones coronales que corresponden a la transición fronto-parietal, tomando como referencia estructuras subcorticales como la comisura blanca anterior, la región anterior del hipotálamo, el estriado y el pálido ventral. Este sector corresponde aproximadamente a las coordenadas bregma 0.2 mm, interaural 9.2 mm del Atlas de Paxinos.¹⁹ En este sector se reconocen bien las áreas de injuria isquémica, foco y penumbra.

En la corteza cerebral de los animales controles el mayor número de neuronas inmunohistoquímicamente positivas para parvoalbúmina se concentra en las láminas IV, V y VI (Ver figuras 1a, 2a, 3a, 4a). El marcaje es intenso en los somas, procesos dendríticos y conjuntos de axones que discurren en diversas direcciones, la mayoría con apariencia varicosa. La distribución y morfología de estas células permite sugerir que corresponden a células en cesta y células en candelabro. En las capas supragranulares, se observa inmunorreactividad en algunos cuerpos neuronales que aparecen dispersos, preferencialmente en la lámina II. Es notable la ausencia de somas marcados en la lámina I, aunque se puede reconocer el perfil de algunas neuritas, probablemente derivadas de capas inferiores.

Foco isquémico

La identificación de células inmunopositivas para parvoalbúmina no fue posible en el foco isquémico, dado

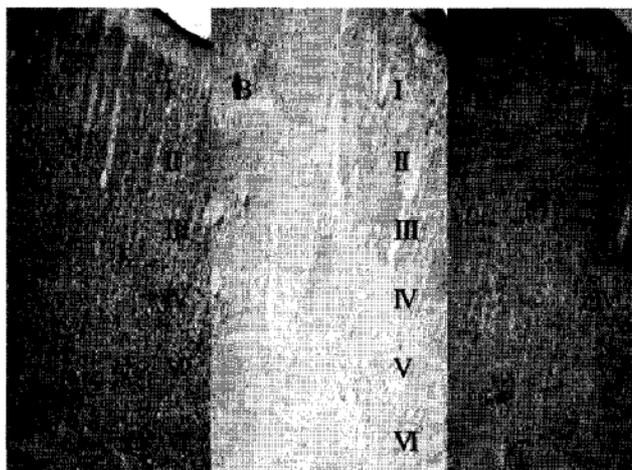


Figura 1. a) Corteza cerebral normal. La distribución de parvoalbúmina predomina en las láminas infragranulares IV, V y VI. b) Corteza Isquémica, zona de penumbra. A las 12 horas post isquemia se observa pérdida total de la inmunoreactividad para parvoalbúmina. c) Corteza contralateral. A las 12 horas hay una evidente disminución del número de células marcadas en las regiones infragranulares, acompañada de incremento en el número de células inmunopositivas para parvoalbúmina en las capas supragranulares. (4x)

el extenso grado de destrucción celular y la pérdida absoluta de la organización cortical en estos sectores. Por el contrario en las zonas adyacentes al foco, penumbra isquémica y sectores contralaterales al foco y a la penumbra, es posible identificar inmunohistoquímicamente la expresión de esta proteína atrapadora de calcio y su evolución en los diferentes períodos de supervivencia analizados 12, 24, 72 horas, 10 y 22 días. Por lo tanto el siguiente análisis hace referencia a la zona de penumbra cortical y a las regiones homólogas del hemisferio contralateral tanto del foco como de la penumbra.

Evolución de la zona de penumbra en los diferentes tiempos de supervivencia

Supervivencia postisquémica corteza ipsilateral: a las 12 horas postisquemia, la zona de penumbra presenta una escasa inmunopositividad para parvoalbúmina. No es posible identificar las láminas corticales, ni cuerpos celulares marcados, pero se observan procesos varicosos dispersos inmunopositivos (Ver figura 1b).

A las 24 horas postisquemia en contraste con el período de supervivencia anterior, se aprecia inmunorreactividad para parvoalbúmina, aunque ésta presenta un patrón diferente al del control. La diferencia es notable, dado que aparece un mayor número de células positivas para parvoalbúmina en las láminas II y III, comparadas con el control. De otra parte reaparecen células inmunopositivas en las capas IV, V y VI con apariencia similar a las del control, aunque su número es

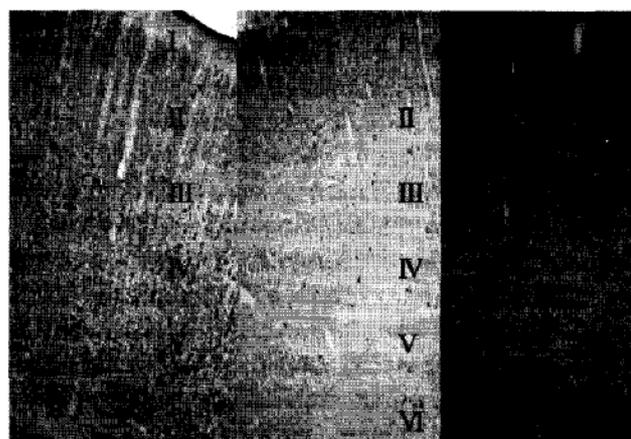


Figura 2. a) Corteza cerebral normal. b) Corteza Isquémica, zona de penumbra. A las 24 horas post isquemia se observa una escasa inmunoreactividad a parvoalbúmina en las láminas infragranulares y presencia de células positivas en las láminas supragranulares. c) Corteza contralateral. Se observa persistencia de la disminución de la inmunoreactividad para parvoalbúmina en las láminas infragranulares acompañado de células marcadas en las láminas supragranulares. (4x)

notablemente inferior (Ver figura 2b). A pesar de que el tamaño de los somas marcados es equivalente al de los controles en las mismas láminas, resulta difícil identificar los procesos que se derivan de estas células.

A las 72 horas y a los 10 días postisquemia la distribución de células inmunopostivas para parvoalbúmina parece aproximarse a la del control, sin embargo el número de células positivas es menor en las capas infragranulares y se conserva la expresión aumentada de parvoalbúmina en las capas supragranulares (Ver figura 3b).

A los 22 días postisquemia la distribución de células positivas para parvoalbúmina en las capas infragranulares tienen la apariencia del control, incluyendo la presencia de procesos marcados, sin embargo persiste la presencia de un mayor número de neuronas inmunopostivas en las capas supragranulares comparadas con los controles (Ver figura 4b).

Supervivencia postisquémica corteza contralateral al foco y a la penumbra: aunque nuestro modelo de isquemia focal por oclusión de la arteria cerebral media involucra la injuria directa de las regiones de foco y penumbra en el territorio de la arteria unilateralmente, nos propusimos evaluar si existen efectos indirectos (exofocales) de la injuria isquémica, identificando la expresión de parvoalbúmina en la población de interneuronas de zonas del hemisferio contralateral, cuyos axones por su carácter, no se extienden al hemisferio opuesto, su influencia es local, pero al mismo tiempo reciben aferentes excitatorios glutamatérgicos del hemisferio contralateral. En este contexto quisimos establecer si las zonas contralaterales al foco y a la penumbra evolucionan de la misma manera.

A las 12, 24 y 72 horas en las regiones contralaterales al foco se observa incremento en el número de neuronas inmunoreactivas en las capas II y III, especialmente células multipolares y fusiformes. En las capas IV, V y VI se observa disminución en el número de células inmunopositivas para parvoalbúmina (Ver figuras 1c, 2c, 3c). En las zonas contralaterales a la penumbra aparece un incremento del número de células inmunopostivas, pero aunque éstas superan a la del control, su densidad es menor que la de las zonas adyacentes, es decir las contralaterales al foco.

Entre los 10 y 22 días las capas infragranulares de las regiones exofocales al foco y a la penumbra toman una apariencia muy similar a lo normal en cuanto al número de células, y aunque disminuido el número de células

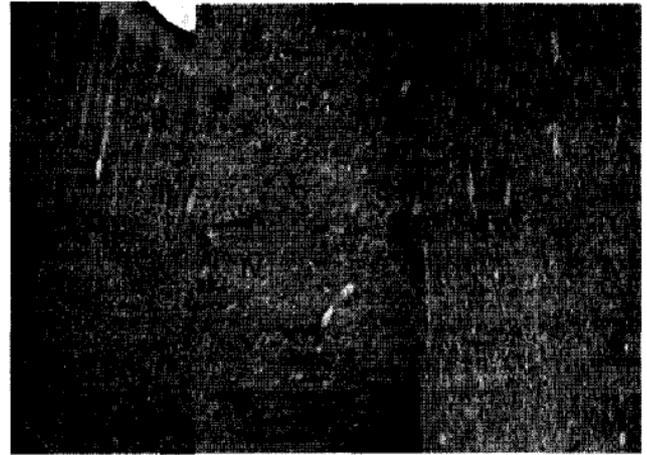


Figura 3. a) Corteza cerebral normal. b) Corteza ipsilateral, área de penumbra 72 horas post isquemia. Persiste la disminución del número de células marcadas en las láminas infragranulares con presencia de somas marcados en la región supragranular. c) Corteza contralateral. La inmunorreactividad para parvoalbúmina permanece disminuida en las láminas infragranulares con expresión de la proteína en células supragranulares. (4x)

positivas para parvoalbúmina en las capas supragranulares su expresión es mayor que en el control (Ver figura 4b).

Hipocampo

En esta región arquicortical, las neuronas positivas para parvoalbúmina corresponden principalmente a células localizadas en el estrato piramidal cuyas extensas prolongaciones cursan en dirección al estrato radiado en todos los sectores del cuerno de amón (Ver figura 5a).

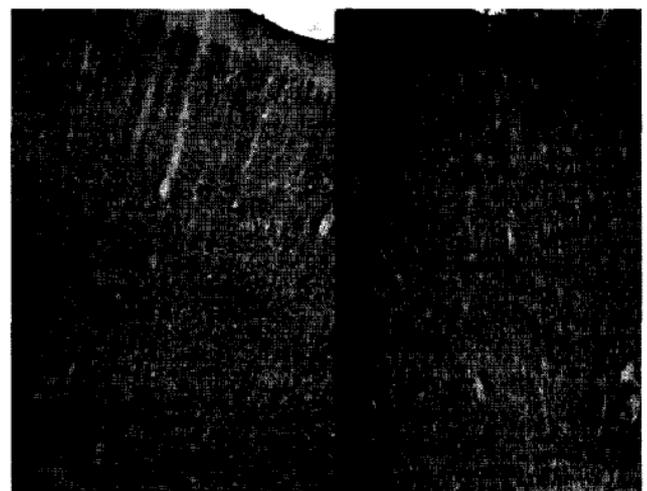


Figura 4. a) Corteza cerebral normal. b) Corteza isquémica, área de penumbra, 22 días post isquemia. Se observa una recuperación moderada del número de células reactivas para parvoalbúmina en las láminas infragranulares con persistencia de la expresión supragranular de la proteína. (4x)

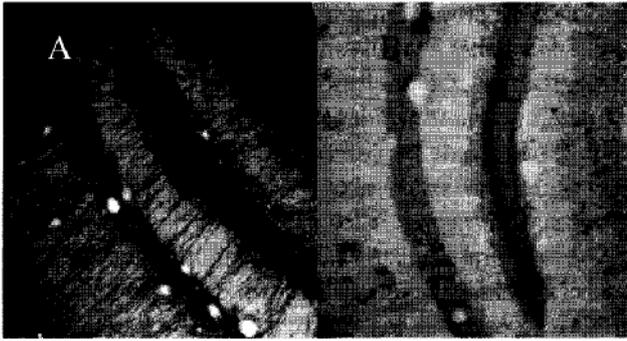


Figura 5. a) Hipocampo normal. Se observa la distribución de neuronas positivas para parvalbúmina en somas y prolongaciones de neuronas en todas las regiones del cuerno de amón. b) Hipocampo isquémico, 24 horas. Se observa disminución del número de células y prolongaciones inmunoreactivas para parvalbúmina en todas las regiones del cuerno de amón, con una marcada disminución en el giro dentado. (10x)

24 horas después de la isquemia se observa una disminución de la inmunoreactividad del neuropilo de estas neuronas, especialmente en el lado ipsilateral a la lesión (Ver figura 5b), pero también se observa una disminución de las varicosidades del lado contralateral. A las 72 horas y a los 10 días la disminución del marcaje neuronal es evidente en ambos hipocampos, pero sigue siendo más acentuada en el lado lesionado. Pasados 22 días hay una recuperación considerable de la inmunoreactividad, y ésta es muy notoria en el lado ipsilateral.

Núcleos de la base

En los individuos controles, la inmunoreactividad para parvalbúmina en el estriado (caudado-putamen) se observa principalmente en los somas y prolongaciones de neuronas multipolares espinosas medianas y grandes, y es más abundante en la porción dorsolateral que en la ventromedial (Ver figura 6a). En el globo pálido se observa también un marcaje intenso de los somas y el neuropilo.

A las 12 y a las 24 horas postisquemia hay una pérdida total del marcaje en el estriado ipsilateral (CPu), acompañado de destrucción tisular marcada (Ver figura 6b). En el modelo utilizado en este trabajo, esta zona está incluida dentro del foco isquémico. En el estriado contralateral se aprecia una disminución en el número de neuronas positivas para parvalbúmina. El globo pálido ipsilateral muestra disminución del número de somas y de procesos inmunoreactivos, mientras que el contralateral muestra principalmente disminución en el carácter varicoso del neuropilo, pero no en el número de somas marcadas. Estos cambios persisten a las 72 horas. A los 22 días hay una leve recuperación de los cambios

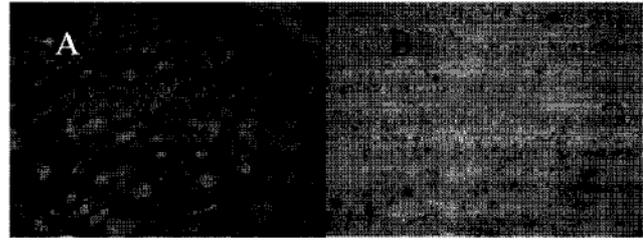


Figura 6. a) Cuerpo estriado (caudado-putamen) normal. Se observa la inmunoreactividad para parvalbúmina en neuronas multipolares medianas. b) Cuerpo estriado isquémico, 24 horas. Hay una disminución del número de células marcadas y de la inmunoreactividad del neuropilo. (10x)

identificados en la zona de oligemia, pero las variaciones presentes en el estriado contralateral y en el globo pálido tanto ipsi como contralateral persisten.

DISCUSIÓN

La parvalbúmina es una proteína que pertenece a la familia EF-hand, un conjunto de proteínas ligadoras de calcio cuyas funciones incluyen la transducción directa de señales mediadas por calcio y el control de la homeostasis del mismo en las células que las expresan.^{20,21} Se ha propuesto que las proteínas atrapadoras de calcio, calbindina D28K, calretinina y parvalbúmina actúan como búferes de calcio amortiguando su sobrecarga inducida por fenómenos de sobreexcitación o injuria del tejido.^{22,23} Sin embargo su papel protector ha sido controversial, especialmente en el caso de la parvalbúmina.¹⁶ Varios grupos de investigación han mostrado evidencias de que las proteínas atrapadoras de calcio pueden tener un efecto protector,²⁴ ningún efecto²⁵ y aún un efecto deletéreo.²⁶ Al respecto Hartley²⁶ encontró que la expresión de parvalbúmina en cultivos de neuronas corticales incrementa la neurotoxicidad inducida por N-metil D-aspartato. Recientemente, Dórlando¹⁵ luego de utilizar células de neuroblastoma de retina N18-RE105, a las que les introdujo cDNA de proteínas atrapadoras de calcio, calbindina, calretinina y parvalbúmina y las sometió a aplicación de l-glutamato para inducir excitotoxicidad, encontró que los clones que expresan parvalbúmina son tan sensibles a la injuria como los que no y propone que otros factores pueden influir sobre la susceptibilidad de las neuronas a fenómenos excitotóxicos tales como la conectividad con las neuronas vecinas, la influencia de las glías y otros factores intrínsecos como las propiedades electrofisiológicas (patrón de descarga o actividad eléctrica). En el presente trabajo se demostró que los cambios en la expresión de parvalbúmina se extienden más allá de las zonas infartadas según se discutirá más adelante.

La parvoalbúmina, se expresa en interneuronas gabaérgicas de la corteza cerebral de los mamíferos,²² aunque también se han descrito en neuronas piramidales pequeñas en la corteza del primate. Una subpoblación de neuronas del estriado en su mayoría gabaérgicas también son inmunopositivas para esta proteína.²⁷ Neuronas de relevo talamocortical que forman conglomerados discretos en diversos núcleos talámicos también contienen parvoalbúmina,²⁸ de tal forma que algunos perfiles de axones positivos para parvoalbúmina presentes en la corteza cerebral son de origen talámico. Los estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos contra la parvoalbúmina en el sistema nervioso central, muestran que en la corteza cerebral las neuronas marcadas corresponden a las células en cesta (basket cells) y a las células en candelabro (chandelier). Las células en cesta se conectan con los cuerpos de las neuronas piramidales glutamatérgicas localizadas en las láminas III y V de la corteza cerebral, de manera que modulan la actividad excitatoria al establecer sinapsis inhibitorias sobre el soma de estas neuronas.^{29,30} Por otra parte, las células en candelabro son neuronas gabaérgicas cuyas terminales sinápticas forman contactos seriados denominados cartuchos o cartridges sobre el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales, donde se considera que ejercen una potente acción inhibitorial sobre las neuronas de proyección corticales. Las células en cesta y las células en chandelier reciben contactos excitatorios glutamatérgicos derivados de fibras corticocorticales (comisurales y asociativas) y tálamo corticales; de igual manera otras neuronas gabaérgicas corticales especialmente células de doble bouquet ejercen acciones inhibitorias sobre estas células.

En el cuerpo estriado y en el globo pálido la marcación es muy definida en neuronas multipolares medianas. Estas neuronas son consideradas como neuronas de proyección, y hacen parte de los circuitos cortico-estriatales talamocorticales, indispensables en la regulación de las funciones cognitivas, motoras y emocionales.³¹ La proyección del estriado sobre el globo pálido y sobre la sustancia nigra reticulata del mesencéfalo, implica la transferencia de las funciones neocorticales asociativas y allocorticales límbicas a estos sectores, que a su vez se proyectan a zonas relacionadas con la regulación del estado de alerta y con el ciclo sueño-vigilia, como son la formación reticular del tegmento mesencefálico y el núcleo reticular del tálamo.

En el presente trabajo hemos demostrado: 1) Que la expresión inmunohistoquímica de la proteína atrapadora de calcio parvoalbúmina esta alterada en múltiples regiones del encéfalo en animales sometidos a isquemia focal, los

cambios comprometen a ambos hemisferios y por lo tanto se extienden más allá del campo de influencia de la arteria cerebral media, cuya oclusión fue unilateral. 2) que en las estructuras comprometidas existen variaciones regionales en la expresión de los cambios inmunohistoquímicos de la proteína parvoalbúmina; por ejemplo en la corteza cerebral, la respuesta en la expresión es opuesta entre las láminas supra e infragranulares, incrementos en las primeras y disminución en las segundas. 3) En el caso de la corteza cerebral los cambios aunque dramáticos al principio (primeros 10 días), parecen progresar hasta estabilizarse alrededor de los 22 días y aproximarse a la apariencia de los animales control. 4) La progresión de estos cambios es diferente entre la penumbra isquémica y las regiones exofocales y no parece depender en estos de la presencia de flujo sanguíneo, por lo tanto otros factores focales como el contexto sináptico, balance en la actividad glutamatérgica excitatoria - inhibición gabaérgica, podrían ser factores contribuyentes para la expresión de estos cambios, considerando que las regiones supra e infragranulares de la corteza cerebral presentan particularidades en la organización de sus circuitos y en sus sistemas de colaterales recurrentes. 5) Al presente no se tiene una explicación de porqué ocurren estos cambios en la expresión inmunohistoquímica de parvoalbúmina, en las regiones sometidas a injuria, o mas allá de las mismas (regiones exofocales), sin embargo se podría plantear al menos una hipótesis que deberá ser probada en otros protocolos experimentales: la señal para la inducción de los cambios exofocales implicaría procesos de hiperactividad glutamatérgica en las zonas de injuria, con incrementos en la liberación de glutamato en regiones exofocales seguida de cascadas de eventos excitatorios en circuitos progresivamente mas lejanos de las zonas de injuria; estos cambios sutiles en la actividad no necesariamente implicarían la muerte neuronal sino estadios funcionales diferentes. Al respecto, Arango, Pimienta y Escobar³² al evaluar los cambios inducidos por isquemia sobre células excitatorias de la corteza cerebral (células piramidales), sustentan sus observaciones exofocales basados en diferentes resultados experimentales, que apoyan la hipótesis de la diasquisis formulada originalmente por Von Monakov.³³ Von Monakov se refirió a la diasquisis como a la pérdida de función que ocurre en regiones alejadas a un foco de lesión y lo interpretó como una pérdida de aferencias excitatorias. El fenómeno de la diasquisis desde su formulación alrededor de la segunda década del siglo pasado ha sido utilizado en otras aproximaciones experimentales, así se han demostrado cambios eléctricos, del flujo sanguíneo, del metabolismo cerebral, neuroquímicos y neuroanatómicos tanto macro como microscópicos. Los cambios pueden identificarse en las

fases aguda, subaguda y crónica postlesión. En humanos se presentan cambios en la actividad eléctrica, flujo sanguíneo y actividad metabólica durante las primeras 24 horas después de una isquemia cerebral. En diferentes modelos experimentales que incluyen roedores, felinos y primates sometidos a isquemia experimental, se han demostrado cambios electroencefalográficos, incrementos de la amplitud de los potenciales evocados somatosensoriales, disminución del metabolismo de la glucosa y disminución del flujo sanguíneo cerebral, especialmente en lesiones grandes.^{34,35}

Los potenciales evocados somatosensoriales en la corteza cerebral de humanos, después de 24 horas de una lesión isquémica cerebral, incrementan su amplitud y su evolución en el tiempo varía dependiendo del sitio de la lesión: si se trata de un compromiso cortical el fenómeno es notable a partir de los 10 días postisquemia, en cambio si la lesión es subcortical los cambios eléctricos se instauran a partir del tercer día. Por su parte el flujo sanguíneo cerebral, entre los días 7 y 10 disminuye en espejo en la corteza contralateral a la lesión. Este hecho cede gradualmente con el transcurso de los meses, sin embargo en el hemisferio ipsilateral el fenómeno persiste, especialmente si la lesión involucra un volumen grande de tejido. Al mismo tiempo el metabolismo de la glucosa y el consumo de oxígeno después de 24 horas postisquemia pueden estar disminuidos en el hemisferio contralateral y especular a la lesión.³⁵

El territorio vascular de la arteria cerebral media comprende principalmente la corteza frontoparietal lateral y la región laterodorsal de los núcleos de la base. Por lo tanto, muchos de los cambios celulares presentes en otras estructuras ipsilaterales y contralaterales al foco isquémico no pueden ser explicadas como consecuencia de la obstrucción directa del flujo sanguíneo. Se ha establecido desde hace varios años la existencia de un área de penumbra alrededor del foco isquémico, la cual para el modelo utilizado en este trabajo corresponde a las regiones adyacentes del neocórtex, la corteza entorrinal y el caudado medial.³⁶ Desde hace varios años los esfuerzos terapéuticos se encaminan a la recuperación del área de penumbra, en la cual no hay predominio de la muerte celular necrótica, pero si se desencadenan fenómenos apoptóticos que llevan a una pérdida neuronal y funcional tardía. La progresión de los cambios en regiones exofocales podría estar asociada a la variación en los circuitos sinápticos que pueden llevar a situaciones disfuncionales. Clínicamente es conocido que pacientes que sufren un accidente cerebrovascular pueden desarrollar alteraciones en su esfera emocional la cual no se explicaría solo por el sitio de lesión primaria.^{37,38}

Sin embargo, muchas de las consecuencias psiquiátricas de la isquemia cerebral no son atribuibles a los cambios en la zona infartada y en la penumbra. Las áreas distantes al foco lesional se denominan exofocales, y los cambios moleculares que se manifiestan en estas zonas pueden ser atribuibles a las alteraciones transinápticas facilitadas por la extensa conectividad del sistema nervioso central. Estos cambios pueden ser detectados por métodos neurofisiológicos y neurobiológicos como la inmunohistoquímica, la cual permite evaluar los cambios en el tiempo de la expresión de diversos marcadores celulares.

En el hipocampo, las interneuronas gabaérgicas reciben sinapsis procedentes de neuronas piramidales contralaterales a través de las fibras comisurales del fórmix. Por lo tanto, aun cuando la disminución de la inmunorreactividad es menos severa que en otros sectores de la corteza cerebral y la recuperación celular es aparentemente mejor, la deafferentación resultante del daño en los circuitos glutamatérgicos del hipocampo del lado isquémico produciría una disminución de la estimulación excitatoria de las neuronas gabaérgicas. Este fenómeno ha sido descrito en otras patologías como la esclerosis hipocámpal secundaria a epilepsia del lóbulo temporal y se ha denominado sueño de las células en cesta.³⁹ Esto implica que el daño excitotóxico generado sobre las neuronas piramidales del hipocampo del lado contralateral a la lesión se ve agravado por la disminución de la disponibilidad de gaba sináptico en un sector de la corteza cuya naturaleza altamente excitable es bien conocida. La pérdida temporal o permanente en la capacidad de la memoria anterógrada en los pacientes se relaciona con la disfunción hipocámpal resultante.

El compromiso de la corteza cerebral y del estriado en las zonas del foco y en la penumbra puede reflejarse también sobre diversos núcleos del tallo cerebral como los grupos monoaminérgicos que reciben fibras de estos sitios y a su vez se proyectan sobre las estructuras sometidas a la injuria isquémica. De forma especulativa se podría plantear que la actividad de estos núcleos estaría comprometida en la aparición de síntomas psiquiátricos como la depresión que se observa en los pacientes que han sobrevivido a un accidente cerebrovascular isquémico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle y a Colciencias por el apoyo financiero para la ejecución de este trabajo. Proyecto 1106-04-11990.

REFERENCIAS

1. Robinson R. Neuropsychiatric consequences of stroke. *Annu Rev Med* 1997; 48:217-229
2. Starkstein S E, Fedoroff P, Price T R, Leiguarda R, Robinson R. Apathy following cerebrovascular lesions. *Stroke* 1993;24:1625-1630
3. House A, Dennis M, Molineus A. Emotionalism after stroke. *Br Med J* 1989; 298: 991-994
4. Ramassubu R. Relationship between depresión and cerebrovascular disease conceptual issues. *Journal of Affective Disorders*. 2000; 57:1-11
5. Arango CA, Pimienta H J, Escobar M I. Depresión postisquémia cerebral: Una aproximación fisiopatológica y clínica. *Revista Colombiana de Psiquiatría* 2000. Vol 24 (4): 321-344
6. Ottersen O P, Storm-Matisen. Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate In *Glutamate Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier 2000;18:144
7. Olney J. Excitotoxic aminoacids and neuropsychiatric disorders. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1990; 30:47-71
8. Mc Donald E, Widenback A. Mechanisms of neurotoxic injury and cell death. *Neurologic Clinics* 2000; 18(3): 525-540
9. Meldolesi J. Rapidly exchanging Ca⁺⁺ stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Progress in Neurobiology* 2001; 65: 309-338
10. Lerma J et al. Excitatory amino acid activated channels. In *Ion Channel Pharmacology*, Edited by Soria B and Ceña. V. Oxford University Press 1998: 399-421
11. Hansson F, Muyderman H, Leonova J, Allason L, Sinclair J, Blostrand F and Thorlin T. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cellswelling and gap-junction communication. *Neurochemistry International*. 2000; 37: 317-329
12. Kita H. Parvalbumin immunopositive neurons in rat globus pallidus-at light and electron microscopic study. *Brain Res* 1994; 657: 31-41
13. Celio M R. Calbindin and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 1990;35:375-475
14. Guentchev M, Hainfellner J A, Trabattoni G R and Budka H. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt- Jacob disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1997; 56(10): 1119-1124
15. D'Orlando C, Celio M R and Schwaller B. Calretinin and calbindin D 28K, but not parvalbumin protect against glutamate- induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells. *Brain Res* 2002;945:181-190
16. Bouillere V, Schwaller B, Schurmans S, Celio M R and Fritschy J M. Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin or calretinin. *Neuroscience* 2000; 97(1):47-58
17. D'Orlando C, Benoit F, Schwaller B, Salicio V, Bloc A, Got V and Celio M R. Calretinin and calbindin D 28 K delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected cells. *Brain Res* 2001; 909 (1-2): 145-158
18. Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91
19. Paxinos G and Watson Ch. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York. Second Edition 1986
20. Schwaller B. Calcium-binding proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group 2001:1-8.
21. Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trend in Biochemical Sciences*. 1996; 21:219-290
22. Hoff P, Glezer I, Condé F, Flagg R, Rubin M, Minchinsky E, Vogt D. Cellular distribution of the calcium binding proteins parvalbumin, calbindin and calretinin in the neocortex of mammals: Phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 1999; 16: 77-116
23. Baimbridge K G, Celio M R and Rogers J H. Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* 1992: 302-308
24. Figueredo-Cárdenas G, Harris C L, Anderson K D, Reiner A. Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin in quinoleic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types. *Exp Neurol* 1998; 149: 356-372
25. Airaksinen M S, Thoenen H, Meyer M. Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin D28K-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP- treated and weaver mice. *Eur J Neurosci* 1997;9: 120-127
26. Hartley D M, Neve R L, Bryan J, Ullrey D B, Bask S Y, Lang P, Sèller A I. Expression of the calbindin-binding proteins, parvalbumin in cultured cortical neurons using a HSV-1 vector system enhances NMDA neurotoxicity. *Mol Brain Res* 1996;40:285-296
27. Cooper A J, Stanford I M. Calbindin D-28K positive neurons and calretinin positive interneurons of the rat globus pallidus. *Brain Research*

- 2002; 929(2): 243-251
28. Munkle M C, Waldvogel H J, Faull RL. The distribution of calbindin, calretinin and Parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *J Chem Neuroanat* 2000; 19(3): 155-173
 29. DeFelipe J. Neocortical neuronal diversity: Chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins and cell surface molecules. *Cerebral Cortex* 1993;3(4):273-286
 30. Arellano J, De Felipe J and Muñoz A. PSA-NCAM immunoreactivity in chandelier cell axon terminals in the human temporal cortex. *Cerebral Cortex* 2002;12(6): 617-624
 31. Escobar M, Pimienta J. Sistema nervioso: neuroanatomía funcional, neurohistología, neurotransmisores, receptores y clínica. Segunda edición. Editorial Universidad del Valle. 1998:119-133
 32. Pimienta H J, Arango CA, Pedroza A, Escobar MI. Respuesta neurobiológica a la lesión cerebral isquémica: zona de infarto, zona de penumbra y regiones exofocales. *Neurociencias en Colombia* 2000; 8(1):13-25
 33. Andrew R. Transhemispheric diaschisis. A review and comment. *Stroke* 1991; 22: 943-949
 34. Belayeb L, Zhao W, Busto R, Ginsberg M. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture I: three dimensional autoradiographic image-analysis of focal cerebral glucose metabolism blood-flow interrelationship during ischemia and early recirculation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 12:1267-1280
 35. Shao W, Belayeb L, Ginsberg M. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture II: Neurological deficit and pixel based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;12:1281-1290
 36. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 1999; 70(4):1431-1568
 37. Philip RP, Morris MD, Robinson RG, De Carvalho M L, Albert P, Wells J, Samuels J, Eden-Fetzer D, Price T R. Lesion characteristics and depressed mood in the stroke data bank study. *J of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience* 1996;8:153-159
 38. Astrom M. Generalized anxiety disorder in stroke patients: a year longitudinal study. *Stroke* 1996; 27:270-275
 39. Xu, Z. Zeng, Y. Coexistence of Necrosis and Apoptosis in Rat Hippocampus Following Transient Forebrain Ischemia. *Neuroscience Research*, Vol 37, Issue 2, June 2000