



Artículo original

Evaluación de la diáskisis transcallosa en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas

Assessment transcallosal Diaschisis in a model of focal cerebral ischemia in rats

César Augusto Arango-Dávila^{1,2}, Beatriz Elena Muñoz Ospina^{1,3}, Daniel Manrique Castaño³, Laura Potes^{1,2}, John Umbarila Prieto⁴.

¹Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia.

²Grupo de Investigación Biomédica, Universidad ICESI, Cali, Colombia.

³Grupo Medición y Evaluación Psicológica, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia.

⁴Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo –CIID. Fundación Innovación y Ciencia por Colombia. FICC, Bogotá, Colombia.

Arango-Dávila CA, Muñoz OBE, Manrique CD, Potes L, Umbarila PJ. Assessment transcallosal Diaschisis in a model of focal cerebral ischemia in rats. *Colomb Med (Cali)*. 2016; 47(2): 87-93

© 2016 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acreditan.

Historia:

Recibido: 05 noviembre 2015
Revisado: 26 abril 2016
Aceptado: 19 mayo 2016

Palabras clave:

Isquemia cerebral, inmunohistoquímica, lesión cerebral, estrés fisiológico, apoptosis.

Keywords:

Brain ischemia, immunohistochemistry, brain injury, physiological stress, apoptosis.

Resumen

Objetivo: Evaluar los cambios exofocales transcallosos después de lesión isquémica focal en ratas, mediante marcación inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-NeuN (Mouse Anti-Neuronal Nuclei).

Métodos: Se intervinieron 28 ratas machos Wistar adultas. Mediante el modelo experimental de isquemia cerebral focal del territorio de la arteria cerebral media por filamento intraluminal, se les ocasionó una lesión focal en el hemisferio derecho. Posteriormente se evaluó el hemisferio contralateral, marcando la población neuronal con el anticuerpo monoclonal anti-NeuN. Se definieron cinco grupos de evaluación: uno de control, 24 horas, 96 horas, 10 días y 20 días. Se evaluaron los cambios neuronales exofocales después de la lesión con base en la observación de los cambios en la inmunoreactividad de las neuronas al NeuN.

Resultados: Se redujo la inmunoreactividad en la corteza contralateral a la lesión. Este fenómeno fue más notable en las capas supragranulares después de 24 horas post isquemia. Después de 96 horas hubo una disminución generalizada de la inmunoreactividad en las capas supra e infragranulares. A los 10 y 20 días, el tejido recobró alguna inmunoreactividad NeuN, estos cambios se dieron en la capa VI.

Conclusiones: Los cambios inmunorreactivos a NeuN apoyan el proceso de diáskisis interhemisférica. Los cambios en la inmunoreactividad podrían indicar estrés metabólico secundario a la interrupción en la conectividad con el sitio de la lesión.

Abstract

Objective: To evaluate transcallosal changes after a local ischemic injury in rats by using the monoclonal marker anti-NeuN (Mouse anti-neuronal nuclei).

Methods: Twenty eight adult, male, Wistar rats were subjected to focal injury in the right hemisphere. The technique used was the experimental model of focal ischemic injury through intraluminal suture of the middle cerebral artery. Analyses were made for the five groups: and after the lesion (control), at 24 hours, 96 hours, 10 days and 20 days. Exofocal neuronal damage was inferred from neuronal immunoreactivity changes to NeuN.

Results: In the cortex contralateral to the lesion, immunoreactivity was diminished. This was most notable in the supragranular layers 24 hours post ischemia. After 96 hours, there was a generalized diminishment of the immunoreactivity in supra and infragranular layers. At 10 and 20 days, the tissue recovered some NeuN immunoreactivity, but there were set changes in the VI layer.

Conclusion: The immunoreactive changes to NeuN support the process of interhemispheric diaschisis. Changes in immunoreactivity could indicate metabolic stress secondary to the disruption in connectivity to the site of lesion.

Autor de correspondencia:

César Augusto Arango Dávila. Av. Simón Bolívar. Cra 98 # 18-49 Cali, Colombia. Tel: +57 2 331 9090, Fax: + 57 2 5551586. E-mail: caarango@fcvl.org.

Introducción

La enfermedad cerebrovascular es un problema de salud pública en el mundo. Corresponde a la principal causa de incapacidad permanente en adultos y la tercera causa de muerte en los países desarrollados¹. Una de cada seis personas sufre accidentes cerebrovasculares (ACV) como consecuencia de la enfermedad cerebro vascular durante su vida y cerca del 30% presentan disfunciones graves o permanentes que los hacen dependientes de otras personas. De acuerdo al área cerebral comprometida, las alteraciones pueden ser motoras, sensoriales, mnésicas o cognitivas, entre otras, aunque por lo general el compromiso es mixto². Las alteraciones pueden modificarse con el tiempo debido a cambios exofocales ocasionados desde la lesión por un proceso de plasticidad del sistema nervioso denominado diáquisis³⁻⁵.

Los ACV se pueden dividir en isquémicos, por disminución del flujo sanguíneo en determinada área cerebral; o hemorrágicos, por rotura arterial intracraneal. La práctica clínica da cuenta de que el 85% de los infartos cerebrales son isquémicos; uno de los más comunes es la isquemia focal por obstrucción de la arteria cerebral media (ACM)⁶.

La isquemia cerebral es un proceso fisiopatológico caracterizado por la disminución transitoria o permanente, focal o global, del flujo sanguíneo en el encéfalo que causa diferentes patrones de disfunción del tejido de acuerdo a la severidad y la duración de la isquemia⁷. Cuando el flujo de oxígeno y glucosa está por debajo de 10 mL/100 g/min, hay pérdida de la función de la membrana celular por agotamiento metabólico de las bombas de ATP, se pierde el potencial iónico y se presenta edema celular por incremento de sodio intracelular; conduciendo en minutos a la necrosis del tejido y al desencadenamiento de procesos inflamatorios⁸. Asimismo, hay un aumento de la actividad eléctrica de las membranas celulares al borde del foco; debido al aumento de potasio y glutamato extracelular. Esto aumenta la excitabilidad en las células, incrementa el gasto metabólico y lleva al crecimiento del área infartada. El área directamente afectada se denomina foco isquémico y es la región que muestra las primeras consecuencias de la lesión⁹⁻¹⁰.

Adyacente al foco isquémico se establece la penumbra, un área con poca perfusión en la que persiste un flujo residual, capaz de mantener con vida a las neuronas. Sin embargo, éstas son disfuncionales debido al estrés metabólico. Como en la penumbra no se ha establecido la necrosis, es un área susceptible de recuperación; no obstante, si no se presenta una adecuada reperfusión se presenta necrosis y estabilización del déficit clínico^{7,11}. La penumbra es uno de los objetivos terapéuticos para reducir las secuelas de la isquemia, dado que allí se desencadenan procesos de angiogénesis necesarios para restablecer el flujo sanguíneo y al parecer, para estimular la neurogénesis endógena¹². No obstante, hay sectores del área de penumbra que no se restauran y que a pesar de la normalización del flujo sanguíneo, sufren muerte celular apoptótica días o meses después de la isquemia¹³.

La cascada isquémica no solamente afecta el foco y el área de penumbra, sino también áreas exofocales, ipsilaterales y contralaterales a la lesión, además estructuras como el cerebelo, el tálamo, la sustancia negra y el hipocampo. Estas áreas y las estructuras se alteran en virtud de sus conexiones anatómicas o

funcionales con el foco isquémico y con el área de penumbra¹⁴⁻¹⁶. Este fenómeno no sólo se relaciona con procesos patológicos, sino con la reorganización del sistema nervioso y recuperación funcional¹⁷ y se observa en otros trastornos como tumores, epilepsia y lesiones traumáticas¹⁸.

Hay evidencia de diáquisis transcalsosa o contralateral debido al hallazgo de afecciones cerebrales bilaterales tras lesiones unilaterales. Teniendo como estímulo la lesión, la reorganización del hemisferio no afectado se presenta gracias a la desinhibición de vías comisurales y al relativo incremento de la excitabilidad neuronal subcortical, especialmente la talámica, probablemente como un recurso para contrarrestar la pérdida de función contralateral¹⁹⁻²⁰. En este sentido, las alteraciones exofocales contralaterales se pueden asociar con plasticidad cerebral, mecanismos de reorganización neuronal⁴³ y procesos compensatorios y adaptativos²¹⁻²⁵. Se ha identificado que si se realiza ablación del cuerpo calloso los efectos contralaterales se reducen o no se presentan y que estos cambios generan tolerancia a futuros eventos isquémicos^{24,26}.

En este aspecto, se ha descrito la activación de más de 80 genes en la corteza cerebral ipsilateral y contralateral, en el hipocampo, estriado y el tálamo; estos genes se relacionan con modificaciones circulatorias y metabólicas²⁷. También se ha demostrado arborización dendrítica y crecimiento axonal en el hemisferio contralateral, expresión de neurotrofinas con recuperación motora y sensorial, relacionados con la organización del sistema piramidal después de una isquemia²⁸. Además, hay evidencia de procesos de sinaptogénesis y neurogénesis en algunas áreas y cambios adaptativos en la corteza entorrinal, entre otros^{24-25,29}.

Aunque no es claro el mecanismo de la diáquisis transcortical³⁰, clínicamente, se sabe que las alteraciones contralaterales contribuyen al déficit neurológico y a la heterogeneidad de signos y síntomas a mediano y largo plazo como déficit cognitivo, pérdida de memoria motora, afasia y amnesia episódica³¹⁻³². No obstante, se conocen pocas propuestas para tratar este aspecto del daño cerebral²⁻⁴. De lo anterior se concluye que es importante el estudio del hemisferio contralateral tras la lesión cerebral isquémica como aporte a las teorías de la recuperación y reorganización de las funciones cerebrales. Esto reviste interés clínico debido a que en muchas ocasiones la disfunción y la recuperación no se relacionan directamente con el área y tamaño de la lesión³³. Conocer la fisiopatología de la isquemia y los cambios transcorticales son aspectos fundamentales para entender los procesos de restauración de los sistemas afectados por la lesión y, consecuentemente, poder determinar el tipo de tratamiento más eficaz.

El objetivo de esta investigación fue la caracterización descriptiva de los cambios corticales contralaterales en un modelo experimental de isquemia cerebral focal para evidenciar procesos de reorganización celular, con el fin de entender los cambios fisiopatológicos. Se utilizó el anticuerpo monoclonal específico para neuronas anti-NeuN (Neuronal Nuclei - MAB377) con el cual además del núcleo se logra marcar el soma y los procesos proximales de las neuronas. La marcación no incluye las células gliales ni los componentes vasculares³⁴, a diferencia de los métodos histológicos convencionales que eventualmente pueden causar "ruido" en las observaciones de las células. Dentro del núcleo, la reactividad al NeuN se encuentra preferentemente en las zonas

donde hay baja densidad de cromatina, y prácticamente se excluye de las áreas que contienen ADN densamente empaquetado. La desfosforilación enzimática suprime la inmunoreactividad al NeuN, confirmando que éste es de hecho una fosfoproteína, y se establece que la unión al anticuerpo depende del estado de fosforilación⁹. Es claro que las circunstancias de fosforilación de proteínas se alteran significativamente en la isquemia. El NeuN se ha identificado con la proteína Fox-3 que, como otras proteínas de este tipo, regula el empalme del mRNA³⁵.

En circunstancias patológicas como la isquemia cerebral, la disminución en la cuantificación de células NeuN puede indicar pérdida neuronal por necrosis³⁴. Adicionalmente se ha descrito una correlación entre células apoptóticas, túbulo positivo e inmunoreactividad al NeuN, colocación que relaciona la disminución de la inmunoreactividad al NeuN con muerte celular apoptótica³⁶. Sin embargo, se ha establecido que la disminución en la inmunoreactividad al NeuN puede estar relacionada con la depleción de proteína o por disminución de la inmunoreactividad; cambios no necesariamente relacionados con muerte celular, pero sí con estrés metabólico celular³⁷. Si consideramos que la diáquisis transcallosa corresponde a un fenómeno de estrés celular, evaluar la inmunoreactividad del NeuN en la corteza contralateral a la lesión puede constituirse en un sensible marcador de fenómenos exofocales.

Materiales y Métodos

Se intervinieron 28 ratas machos Wistar adultas con un peso entre 240 y 320 g (promedio 280 g), con edad entre 120 y 180 días; siguiendo el protocolo para evitar el sufrimiento innecesario.

Procedimiento microquirúrgico

Después de un período de 6 h de ayuno, los especímenes experimentales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (40 mg/kg) y atropina (0.1 mg/kg) vía intraperitoneal. La técnica de isquemia cerebral aplicada en este trabajo fue desarrollada por Zea *et al.*³⁸, y perfeccionada por Belayeb *et al.*³⁹. Bajo microscopio quirúrgico se realizó una incisión longitudinal en la línea media del cuello. Se localizaron y disecaron la arteria carótida común y la arteria carótida externa (ACE), que se seccionó, quedando así libre la ACE y ligada en su extremo. Un segmento de nylon monofilamento 4-0 de 3.5 cm se introdujo por el extremo del fondo de saco correspondiente a la ACE hasta una longitud de 17.5 mm y se fijó. Al cabo de 90 min se hala el nylon a través de la herida quirúrgica y se dejó alojado su extremo en el fondo de saco de la ACE para iniciar la reperfusión. A los cuatro especímenes del grupo control se les realizó todo el procedimiento descrito a excepción de que el nylon monofilamento 4-0 no se introdujo hasta el nivel de la ACM. Durante el procedimiento quirúrgico se evaluó regularmente la función cardiorrespiratoria y la temperatura rectal. Se mantuvo la temperatura a 37° C mediante una lámpara de calor. Se establecieron cinco grupos, uno control con cuatro especímenes, y los cuatro restantes con sobrevida de 24 h, 96 h, 10 días y 20 días cada uno con seis especímenes.

Inmunohistoquímica

Al tiempo correspondiente, los especímenes de cada grupo fueron anestesiados y perfundidos 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. Después se practicaron 10 cortes coronales de 30 µm de espesor en el vibrátomo de medio líquido, los cortes se realizaron de acuerdo con las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson⁴⁰ 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. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario NeuN (Neuronal Nuclei - MAB377 Chemicon) por 8 h, después se lavaron en buffer fosfato 10 mM (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). Los cortes seleccionados de las muestras como control al proceso de inmunohistoquímica tuvieron el mismo procedimiento anteriormente descrito, excepto por la incubación con el anticuerpo primario.

Los cortes de los diferentes tiempos experimentales fueron teñidos con 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) para observar el área infartada, para este tipo de tinción vital uno de las ratas de cada uno de los grupos no fue perfundida, se anestesió profundamente y se decapitó, se retiró rápidamente el cerebro de la caja craneal. Los cerebros fueron cortados coronalmente cada 2 mm a partir del polo frontal utilizando una matriz cerebral (Stoelting). Las secciones cerebrales fueron sumergidas en una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 0.1 M pH 7.2 que contenía TTC al 0.5% por 30 min a 37° C. Finalmente, las secciones teñidas fueron fijadas en formalina al 4% y mantenidas a 4° C. Seis secciones por cada cerebro fueron fotografiadas en sus aspectos anterior y posterior y las áreas isquémicas fueron medidas manualmente de manera ciega. El análisis morfométrico y volumétrico implicó corregir el error ocasionado por el edema, para lo cual se utilizó la fórmula [(área del hemisferio normal/área del hemisferio infartado) x área del infarto]⁴¹. Todos los especímenes experimentales presentaron lesión en un área proporcional al corte coronal aproximado en Bregma 2.04 mm de 39.4 ± 4.2%. No hubo diferencias mayores entre los especímenes y la variabilidad en el tamaño entre los grupos fue muy baja. El volumen del daño isquémico se calculó integrando el área de la lesión corregida de los diferentes cortes coronales con la coordenada anteroposterior⁴², de esta manera el resultado se expresa en milímetros cúbicos de lesión, se observó una importante homogeneidad en los diferentes especímenes 162.5 ± 17.5 mm³.

La evaluación de los cortes procesados para NeuN por inmunohistoquímica se realizó de manera cualitativa semiestructurada puesto que cada uno de los investigadores examinó de manera independiente las placas a 10x y a 40x con los cortes de los especímenes del grupo control y de los experimentales, centrando la atención en cortes correspondientes a corteza frontoparietal, esto se hizo de manera sistemática siguiendo una secuencia codificada con un orden previamente establecido y sin conocimiento del tipo de espécimen que se encontraba observando. Previo a este procedimiento se realizó una evaluación y entrenamiento de todos los investigadores para garantizar la mayor objetividad posible en las observaciones. Se inició con una observación global de las láminas a 10x y después una revisión lámina por lámina a 40x desde la I a la VI, prestando atención al grado de inmunoreactividad de las neuronas al NeuN (intensidad de la inmunoreactividad similar al control v/s intensidad de la

inmunoreactividad menor que el control – morfología neuronal similar al control vs morfología neuronal diferente al control). Cada una de las descripciones fueron registradas en el mismo tipo de formato para ser recopiladas por el investigador principal, se seleccionaron imágenes para el análisis de resultados cuando la coincidencia en la observación fue del 80% o más. Para obtener las imágenes se les solicitó a los investigadores seleccionar tres patrones consideradas por ellos como representativas de cada cambio observado como relevante, de esta selección a su vez el investigador principal tomó al azar las imágenes para ilustrar la publicación y para el análisis final.

Por otro lado se cuantificaron los cambios en el número de células NeuN positivas de la lámina VI: se demarcaron tres áreas de tamaño similar por cada uno de los especímenes, se fotografiaron y se procesaron en blanco y negro al 50% en el formato de imagen del programa World de Office, se imprimieron las imágenes y se contaron manualmente las neuronas. Cada uno de los investigadores envió los resultados y se integraron mediante una sumatoria simple para definir la proporción de neuronas con relación al control.

Ética

El control del estado de los 28 sujetos en todas las fases de la investigación se realizó utilizando un protocolo de supervisión que establece criterios para evitar el sufrimiento innecesario, especialmente después de la intervención quirúrgica. El protocolo experimental fue evaluado y autorizado por el comité de ética de la Universidad Libre de Cali, 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.

Resultados

Se procesaron del grupo control 6 especímenes, de los grupos experimentales de 24 h: 4 especímenes, 96 h: 5 especímenes, 10 días: 5 especímenes y 20 días: 4 especímenes.

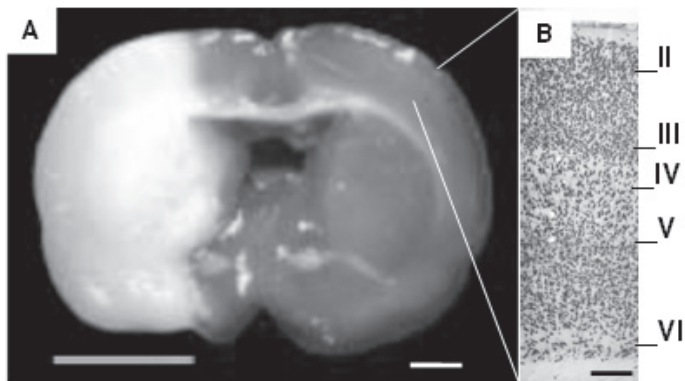


Figura 1. Corte coronal teñido con TTC después de isquemia cerebral focal y reperusión con la técnica de filamento intraluminal. En A, se observa pálida el área de lesión que incluye corteza cerebral y ganglios basales. A la derecha se observa la corteza cerebral ampliada a 10x en la que se diferencian las neuronas marcadas con NeuN organizadas en laminas. Las observaciones descriptivas de todos los especímenes se tomaron del sector aproximado señalado en la imagen que corresponde a un corte coronal en Bregma 2.04 mm. (A barra= 2 mm, B barra= 250 μ m).

La mortalidad en las ratas fue del 21%, distribuida por grupos así: Control (0%), 24 h (7.1%), 96 h (3.6%), 10 días (3.6%) y 20 días (7.1%).

En este estudio se evaluaron de manera cualitativa los cambios en la región contralateral a la lesión de la corteza cerebral frontoparietal. Los resultados se obtuvieron con base en los datos aportados por los grupos de ratas experimentales confrontados con el grupo control y el análisis descriptivo de los cambios en la inmunoreactividad de las neuronas al NeuN. En todos los especímenes sometidos a isquemia y reperusión se observó una lesión frontoparietal en el territorio de la ACM del tejido ipsilateral a la lesión, lo que comprende una pérdida de las características anatómicas e histológicas con grados de daño neuronal que van desde lesión evidente a las 24 h, hasta pérdida total del tejido con formación de zonas quísticas (Fig. 1), como lo hemos reportado en otros estudios^{4,9,33}.

A las 24 h, en zona contralateral se presentaron cambios en las neuronas con disminución de la inmunoreactividad al NeuN en comparación con los controles (Fig. 2 C y D), estos cambios son notables en las laminas supragranulares. A las 96 h postisquemia, en la corteza del hemisferio contralateral a la lesión, es característica la disminución de la inmunoreactividad celular en capas supra e infragranulares. Además, se aprecian núcleos celulares con fraccionamiento y consolidación con apariencia morfológica que se asemeja a la fragmentación nuclear observada en la muerte celular apoptótica (Fig. 2 E y F). A las 96 h se aprecian

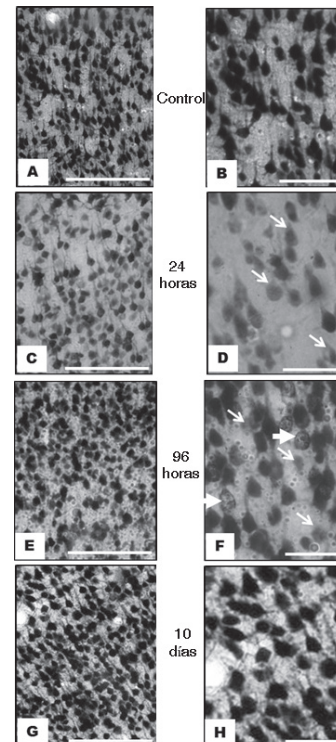


Figura 2. Imágenes representativas de la inmunoreactividad al NeuN en corteza frontoparietal contralateral a la lesión isquémica en un modelo experimental de isquemia cerebral focal de la arteria cerebral media. A y B, imágenes control de la zona infragranular a nivel de la lámina V donde se observa una adecuada inmunoreactividad a las 24 h. C y D, disminución de la inmunoreactividad a las 24 h en corteza cerebral supragranular a nivel de la lámina III (flechas en D). En E y F, a las 96 h, se observa en corteza cerebral infragranular a nivel de la lámina V, neuronas y núcleos celulares con inmunoreactividad heterogénea (las flechas delgadas señalan neuronas con disminución de la inmunoreactividad, las flechas gruesas señalan neuronas con núcleos fraccionados y consolidados). G y H, inmunoreactividad a los 10 días, supragranular a nivel de la lámina III similar al control. Las observaciones descriptivas de todos los especímenes corresponden a cortes coronales entre Bregma 1.80 mm a 2.16 mm, aproximación mediadorsal 3.85 a 4.8 mm y dorsoventral 2 a 3 mm. (Primera columna barra= 250 μ m, segunda columna barra= 25 μ m).

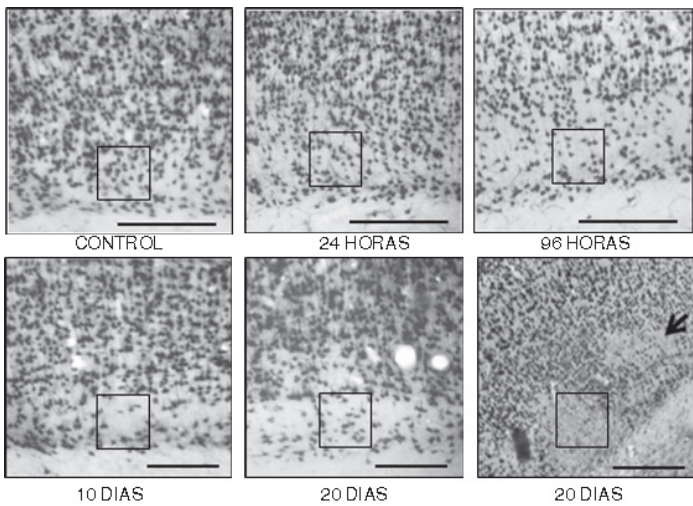


Figura 3. Imágenes representativas de la inmunoreactividad al NeuN de la lámina VI en corteza frontoparietal contralateral a la lesión isquémica en un modelo experimental de isquemia cerebral focal de la arteria cerebral media. A control, B a F cambios en la lámina VI notable en el transcurso del tiempo, se señalan con los recuadros áreas con alteración en la inmunoreactividad al NeuN y aparente disminución de la celularidad, en F con vista panorámica a 10x de aumento, la pérdida se observa en parches en algunos sectores de la lámina VI. El número de neuronas inmunoreactivas disminuye en un 4.5 % a las 24 h, 22.7 % a las 96 h, 36.4% a los 10 días y 40.9% a los 20 días. (barra A a E= 300 μ m, F= 400 μ m).

áreas de transición de un tejido organizado a uno donde se pierde la apariencia citoarquitectónica especialmente en la capa VI, que incluye áreas de alteración en la continuidad de la lámina y una aparente pérdida neuronal (Fig. 3C).

Diez días postisquemia, en el hemisferio contralateral a la lesión, se observaron las láminas corticales sin cambios en la inmunoreactividad al compararlas con el control (Fig. 2G y H). A los 20 días postisquemia el hallazgo es indistinguible de los encontrados en los especímenes de 10 días que consiste en una inmunoreactividad al NeuN similar a los controles; diferente de lo observado en las muestras de 24 y 96 h.

Una observación interesante consistió en que en el 60% de las ratas Wistar se presentaron alteraciones en la morfología de la lámina VI (Fig. 3), cambios que se detectaron de forma más evidente a las 96 h postisquemia (Fig. 3C) y que se continuaron observando hasta los 10 días (Fig. 3D) y 20 días (Fig. 3E), se pudo apreciar en esta lámina una alteración de la citoarquitectura del tejido y una disminución y pérdida de la inmunoreactividad neuronal progresiva: con relación a la cuantificación de neuronas en los controles que definimos como proporción del 100%, el número de neuronas inmunoreactivas disminuyó al 95.5% y 77.3% a las 24 y 96 h respectivamente, a los 10 y 20 días la cantidad de neuronas inmunoreactivas corresponde al 63.6% y 59.1% respectivamente. En vista panorámica a 10x de aumento, la pérdida se observó en parches en algunos sectores de la lámina VI (Fig. 3F).

Discusión

El análisis de los cambios en las neuronas del hemisferio contralateral a una lesión isquémica focal ha sido poco evaluado mediante el uso de marcadores específicos para la población neuronal⁴³⁻⁴⁵. Nagasawa y Kogure⁴⁶ no encontraron anomalías histológicas en el hemisferio contralateral después de una isquemia cerebral focal en un modelo experimental igual al nuestro. Utilizaron la tinción de Nissl y de hematoxilina que no es específica para la

población neuronal⁴². Por otro lado, se han encontrado diferencias en la susceptibilidad al infarto cerebral entre las diferentes cepas de ratas⁴⁷, lo que podría tener relación con la heterogeneidad de los resultados de diferentes investigaciones, sobre todo en lo referente a cambios exofocales contralaterales.

En este estudio se tuvo en cuenta la intensidad de la inmunoreactividad como medida fisiopatológica de daño cerebral isquémico como se ha señalado en otros trabajos^{37,48}. Los cambios más significativos se encontraron en áreas dorsolaterales en ambos hemisferios, regiones que sufren en este modelo mayor pérdida neuronal ipsilateral y cambios en la inmunoreactividad de las neuronas en corteza contralateral. En la región frontoparietal ipsilateral a la lesión, se observaron diversos grados de daño neuronal que van desde necrosis evidente a las 24 h, hasta pérdida total del tejido con formación de zonas quísticas, como se reporta en otros estudios^{49,49}.

Con relación a los cambios exofocales en corteza contralateral a la lesión, nuestro estudio tiene tres aspectos a resaltar. En primer lugar, a las 24 h después de la isquemia se evidenció disminución de la inmunoreactividad al NeuN en las láminas supragranulares de la corteza frontoparietal contralateral a la lesión, a las 96 h, los cambios son evidentes tanto en las láminas supragranulares como en las infragranulares. Llama la atención que algunas neuronas, a las 96 h, presentaron una inmunoreactividad que dan cuenta de una aparente fragmentación de los núcleos, hasta ahora no descritos con NeuN (Fig. 2F). Es importante resaltar que en estudios previos han establecido una colocalización de neuronas con disminución de la inmunoreactividad al NeuN y prueba de túnel positiva³⁷.

En segundo lugar, 10 y 20 días después de la isquemia, la inmunoreactividad al NeuN previamente atenuada se restableció en las zonas supragranulares e infragranulares, pero se evidenció una alteración de apariencia residual en la lámina VI (Fig. 3) dado que permanece desde las 96 h hasta los 20 días posterior a la lesión isquémica. Previamente se han descrito procesos de plasticidad cortical relacionados con conexiones tálamo-corticales dado que la respuesta de la corteza podría tener relación con las aferencias que provienen del tálamo a la lámina VI^{20,50}. Se plantea entonces que aparte de las señales de deaferentación del foco isquémico a través del cuerpo calloso, las aferencias talámicas tendrían un efecto en la reorganización cortical^{17,19}.

En tercer lugar, se ha señalado que los mecanismos de los cambios exofocales transcalsos involucran las conexiones comisurales y la modulación de las sinapsis^{4,15,51}. Se ha observado hiperexcitabilidad en el hemisferio contralateral y cambios en el metabolismo que podrían tener relación con estos cambios exofocales transcalsos⁵². La disminución en la actividad de neuronas gabaérgicas del hemisferio lesionado y el incremento de la actividad glutamatérgica ocasionado por la isquemia se puede traducir en una sobreexcitación en el hemisferio no lesionado²⁶. De esta manera podría explicarse la reorganización de funciones motoras después de un ACV^{51,52}. Se ha descrito que en ratas sometidas a isquemia focal el córtex motor en el hemisferio no isquémico sufre un proceso de reducción de las espinas dendríticas, seguido de arborización en las láminas infragranulares. En el pico del crecimiento dendrítico, 18 días después de la isquemia, la densidad sináptica en las láminas infragranulares y la densidad de espinas es normal¹⁶.

Este es un estudio descriptivo de la inmunoreactividad al NeuN en corteza contralateral a la lesión. Si bien nos permite observar una secuencia de eventos relacionados con la intensidad de la reacción inmunohistoquímica y apreciaciones morfológicas, el resultado debe ampliarse en estudios posteriores en los cuales se puedan evaluar las densidades ópticas y la cuantificación de neuronas. Faltan otros estudios además, que permitan ampliar el papel del anticuerpo NeuN como marcador de estrés celular y posible marcador de muerte celular.

Conclusión

Este estudio muestra de manera descriptiva los cambios en corteza cerebral contralaterales a la lesión después de una isquemia focal transitoria en el territorio de la arteria cerebral media en un modelo experimental en ratas. Se toma la inmunoreactividad al NeuN como el principal medio de análisis. Hasta el momento no se conocen estudios de diáquisis transcallosa con observación de dicho marcador. Se presentó específicamente variación en la intensidad de la inmunoreactividad al NeuN en función del tiempo desde las 24 h hasta los 20 días, observándose una respuesta subcrónica en zonas supragranulares y después infragranulares, es significativa la observación de cambios en la lámina VI que perduran desde las 96 h hasta los 20 días. En términos funcionales, la importancia de los cambios en la inmunoreactividad neuronal al NeuN podría estar asociado con procesos de reorganización celular adaptativa contralateral después del evento isquémico en la que participarían proyecciones cortico-corticales y cortico-talámicas, así como circuitos locales.

Financiación:

Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia (Código 00003579), Línea de Neurociencias y Neuropsicología del Grupo de Medición y Evaluación Psicológica. Proyecto “Reorganización en regiones exo-focales (sustancia negra reticulata y fascículos dendríticos en la corteza frontoparietal) por lesión isquémica focal transitoria experimental en ratas”. Para el procesamiento de la información y síntesis del trabajo se contó con recursos de la Fundación Valle del Lili y la Universidad Icesi de Cali, Colombia. También se contó con recursos de la Fundación Innovación y Ciencia por Colombia FICC a través del Centro de Investigación Innovación y Desarrollo CIID, Línea de Investigación Neurociencias Experimentales, Proyecto “Lesión Cerebral y Neurorehabilitación” aportando con talento humano y registro micro-fotográfico.

Conflicto de interés:

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de interés

Referencias

1. Mozaffarian D. Heart disease and stroke statistics-2015 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 131: e29–e32.
2. Caoa M, Ferrara M, PatellaaÇ R, Marrab C, Rasura M. Neuropsychological findings in young-adult stroke patients. *Arch Clin Neuropsychol*. 2007; 22: 133–42.
3. Bonilha L, Nesland T, Rorden C, Fillmore P, Ratnayake RP, Fridriksson J. Mapping remote subcortical ramifications of injury after ischemic strokes. *Behavioural Neurology*. 2014; 21: 53–80.
4. Arango-Dávila CA, Escobar-Betancourt MI, Buriticá E,

Pimienta H. Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental: una visión experimental y su correlato clínico. *Colomb Med*. 2008; 39: 85–94.

5. Bütefisch CM, Kleiser R, Seitz RJ. Post-lesional cerebral reorganization: evidence from functional neuroimaging and transcranial magnetic stimulation. *J Physiol Paris*. 2006; 99: 437–54.

6. Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammersgaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*. 2009; 40: 2068–72.

7. Dirnagl U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann N.Y Acad Sci*. 2012; 1268: 21–5.

8. Anderova M, Vorisek I, Pivonkova H, Benesova J, Vargova L, Cicanic M, *et al*. Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011; 31: 894–907.

9. Arango-Dávila CA, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*. 2004; 39: 156–65.

10. Kumar A, Aakriti, Supta V. A review on animal models of stroke. *Brain Res Bull*. 2016; 122: 35–44.

11. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*. 2008; 14: 497–500.

12. Ortega FJ, Jolkkonen J. Restorative therapies to enhance sensorimotor recovery following cerebral ischemia. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2013; 73(1): 66–78.

13. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009; 40: e331–9.

14. Chen B, Schulz R, Bönstrup M, Hummel FC, Sedlacik J, Fiehler J, *et al*. Structural plasticity of remote cortical brain regions is determined by connectivity to the primary lesion in subcortical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35(9): 1507–14.

15. Reinecke S, Lutzenburg G, Hagemann G, Bruehl C, Neumann-Haefelin T, Witte OW. Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. *Neurosci Lett*. 1999; 261: 85–8.

16. Nudo RJ. Recovery after damage to motor cortical areas. *Curr Opin Neurobiol*. 1999; 9: 740–7.

17. Guzzetta A, Bonanni P, Biagi L, Tosetti M, Montanaro D, Guerrini R, *et al*. Reorganization of the somatosensory system after early brain damage. *Clin Neurophysiol*. 2007; 118: 1110–21.

18. Gil JL. El enigma de la diáquisis. *Rev Neurol*. 2001; 32: 199–200.

19. Iizuka H, Sakatani K, Young W. Neural damage in the rat thalamus after cortical infarcts. *Stroke*. 1990; 21: 790–4.

20. Reuck J, Decoo D, Lemahieu I, Strijckmans K, Goethals P, Van Maele G. Ipsilateral thalamic diaschisis after middle cerebral artery infarction. *J Neurol Sci*. 1995; 134: 130–5.

21. Lotze M, Beutling W, Loibl M, Domin M, Platz T, Schminke U, Byblow WD. Contralesional motor cortex activation depends on ipsilesional corticospinal tract integrity in well-recovered subcortical stroke patients. *Neurorehabil Neural Repair*. 2012; 26(6): 594–603.

22. Takatsuru Y, Fukumoto D, Yoshitomo M, Nemoto T, Tsukada H, Nabekura J. Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neuroscience*. 2009; 29(32): 10081–6.
23. Hirouchi Y, Suzuki E, Mitsuoka C, Jin H, Kitajima S, Kohjimoto Y, *et al*. Neuroimaging and histopathological evaluation of delayed neurological damage produced by artificial occlusion of the middle cerebral artery in Cynomolgus monkeys: Establishment of a monkey model for delayed cerebral ischemia. *Exp Toxicol Pathol*. 2007; 59: 9–16.
24. González-Aguado E, Martí-Fábregas J, Martí-Vilalta JL. El fenómeno de la diáquisis en la enfermedad cerebral vascular. *Rev Neurol*. 2000; 30: 941–5.
25. Harrison TC, Silasi G, Boyd JD, Murphy TH. Displacement of sensory maps and disorganization of motor cortex after targeted stroke in mice. *Stroke*. 2013; 44(8): 2300–6.
26. Reggia JA. Neurocomputational model of the remote effects of focal brain damage. *Med Eng Phys*. 2004; 26: 711–22.
27. Zhao LR, Mattsson B, Johansson BB. Environmental influence on brain derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*. 2000; 97: 177–84.
28. Keyvani K, Reinecke S, Abts HF, Paulus W, Witte OW. Suppression of proteasome C2 contralateral to ischemic lesions in rat brain. *Brain Res*. 2000; 858: 386–92.
29. Sopala M, Frankiewicz T, Parsons C, Danysz W. Middle cerebral artery occlusion produces secondary, remote impairment in hippocampal plasticity of rats -involvement of N-methyl-D-aspartate receptors? *Neurosci Lett*. 2000; 281: 143–6.
30. Johnston DG, Denizet M, Mostany R, Portera-Cailliau C. Chronic in vivo imaging shows no evidence of dendritic plasticity or functional remapping in the contralesional cortex after stroke. *Cerebral Cortex*. 2013; 23(4): 751–62.
31. Lotze M, Beutling W, Loibl M, Domin M, Platz T, Schminke U, *et al*. Contralesional motor cortex activation depends on ipsilesional corticospinal tract integrity in well-recovered subcortical stroke patients. *Neurorehabilitation Neural Repair*. 2012; 26(6): 594–603.
32. Cramer SC, Bastings EP. Mapping clinically relevant plasticity after stroke. *Neuropharmacology*. 2000; 39: 842–51.
33. Arango-Dávila CA, Pimienta-Jiménez H, Escobar-Betancourt M. Depresión postisquemia cerebral: aproximación clínica y fisiopatológica. *Rev Colomb Psiquiatr*. 2000; 4: 321–44.
34. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, *et al*. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996; 44: 1167–71.
35. Lee JC, Ahn JH, Lee DH, Yan BC, Park JH, Kim IH, *et al*. Neuronal damage and gliosis in the somatosensory cortex induced by various durations of transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res*. 2013; 1510: 78–88.
36. Morancho A, García-Bonilla L, Barceló V, Giralte D, Campos-Martorell M, Garcia S, *et al*. New method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012; 38: 617–27.
37. Unal-Cevik I, Kilinç M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res*. 2004; 23: 169–74.
38. Zea-Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummings R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20: 84–91.
39. Belayeb 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.
40. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press; 1986.
41. 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.
42. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1987; 50: 402–10.
43. Tamura A, Nakane M, Kuroiwa T, Nagaoka T, Sano K. Imaging of remote areas after focal cerebral ischemia. *Int Congr Series*. 2003; 1252: 321–27.
44. Grefkes C, Fink GR. Reorganization of cerebral networks after stroke: new insights from neuroimaging with connectivity approaches. *Brain*. 2011; 134: 1264–76.
45. Zepeda A, Vaca L, Arias C, Sengpiel F. Reorganization of visual cortical maps after focal ischemic lesions. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003; 23: 811–20.
46. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1989; 20: 1037–43.
47. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007; 87: 179–97.
48. Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res*. 1998; 39: 106–20.
49. Wegner S, Weber R, Ramos-Cabrera P, Uhlenkueken U, Sprenger C, Wiedermann D, *et al*. Temporal profile of T2-weighted MRI distinguisher between pannecrosis and selective neuronal death after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26: 38–47.
50. Rossini PM, Calautti C, Pauri F, Baron JC. Post-stroke plastic reorganization in the adult brain. *Lancet Neurol*. 2003; 2: 493–502.
51. Rehme AK, Fink GR, von Cramon DY, Grefkes C. The role of the contralesional motor cortex for motor recovery in the early days after stroke assessed with longitudinal FMRI. *Cerebral Cortex*. 2011; 21(4): 756–68.
52. Bütefisch CM, Kleiser R, Körber B, Müller K, Wittsack HJ, Hömberg V, Seitz RJ. Recruitment of contralesional motor cortex in stroke patients with recovery of hand function. *Neurology*. 2005; 64(6): 1067–9.