

Isquemia cerebral experimental y sus aplicaciones en la investigación en neurociencias

Experimental brain ischemia and its applications on neuroscience research

Carlos Arturo Cassiani Miranda¹, Mayra Tatiana Borrero Varona²

Resumen

La enfermedad cerebrovascular (ECV) isquémica es la tercera causa de muerte en Estados Unidos y otros países industrializados, produce una discapacidad importante en sobrevivientes. Una de las consecuencias más importantes del ictus isquémico es el daño cerebral, resultante de una mezcla compleja de procesos entre los que se incluye la excitotoxicidad mediada por el neurotransmisor glutamato. La excitotoxicidad tiene un papel central en la patología cerebrovascular, pero también en situaciones de trauma agudo y diversas enfermedades neurodegenerativas. El modelo de isquemia cerebral focal por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) en ratas mediante la técnica del filamento intraluminal, ocasiona una lesión frontoparietal cortical y dorsolateral del estriado, permite evaluar fenómenos de estrés celular en el foco isquémico o en áreas de oligemia o penumbra. La isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos moleculares que se inician con el déficit energético relacionado con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y la producción de adenosin trifosfato (ATP). Estos procesos puede ser responsables de varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, la lesión cerebral isquémica, epilepsia y esquizofrenia. El estudio de estos procesos podría aumentar la comprensión de la fisiopatología de la isquemia cerebral, permitiendo el avance en el diseño de estrategias neuroprotectoras, logrando una disminución en la mortalidad y la discapacidad de los pacientes con lesión isquémica.

Palabras clave: isquemia cerebral focal, neurociencias, neurogenesis, neurodegeneración.

Fecha de recepción: 4 de julio de 2013
Fecha de aceptación: 29 de septiembre de 2013

¹ Médico general. Especialista en Pedagogía Para el Desarrollo del Aprendizaje Autónomo. Grupo de Investigación en Salud Pública (GISAP). Residente II de Psiquiatría-Universidad de Cartagena-Grupo de investigación en Psiquiatría y Salud Mental

² Médico interno. Universidad Santiago de Cali-Seccional Palmira. Semillero de investigación GISAP.
Correspondencia: Carlos Arturo Cassiani Miranda Socorro Plan 332 B Manzana 68-Lote 4. Cartagena de Indias-Bolívar. Colombia

Abstract

The ischemic brain disease (IBD) or ischemic stroke is the third cause of death in United States and other industrialized countries, and it generates major disabilities in these patients. One of the most important consequences in the ischemic ictus is the cerebral damage, which is a consequence of a complex mixture of biochemical processes. Among them the excitotoxicity mediated by glutamate. Not only has excitotoxicity a central role in the IBD, but also in situations of acute trauma and in diverse neurodegenerative diseases. The focal model of obstruction of the middle cerebral artery (MCA) in rats by means of intraluminal suture that causes a cortical frontoparietal lesion as well as in the dorsolateral striatum allows evaluating the phenomena of cellular stress in the ischemic focus or in oligaemia areas or ischemic penumbra. The cerebral ischemia unchains a sequence of molecular phenomena that begin with the lack of energy secondary to the interruption of the processes of oxidative phosphorylation and the deficit of adenosin triphosphate (ATP) production. These processes could be responsible for several degenerative illnesses such as Alzheimer's disease, ischemic stroke, epilepsy and schizophrenia. The study of these processes could increase the understanding of the pathophysiology of cerebral ischemia, allowing progress in design of neuroprotective strategies, achieving to decrease the mortality and morbidity of patients with IBD.

Key words: focal brain ischemia, neuroscience, neurogenesis, neurodegeneration.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (ECV) isquémica es la tercera causa de muerte en Estados Unidos y otros países industrializados, y genera una muerte cada 3 a 4 minutos, para una mortalidad anual de más de 137 265 personas (1, 2). Adicionalmente, cada año aproximadamente 795 000 personas sufren un ataque cerebrovascular nuevo o recurrente (2) y produce una discapacidad importante en sobrevivientes (1).

En países con economías no establecidas, como Colombia, la ECV isquémica tiene una prevalencia de 19.9 % (IC 95 % 14,3-27,4) dentro de los trastornos neurológicos más comunes (3) y representa la cuarta causa de mortalidad, la segunda de años de vida potenciales perdidos (AVPP) y la quinta de años de vida saludable perdidos (AVISA) (4).

Una de las consecuencias más importantes del ictus isquémico es el daño cerebral, resul-

tante de una mezcla compleja de procesos, entre los que se incluye la excitotoxicidad, una forma de muerte neuronal producida principalmente por la sobreactivación de los receptores para el neurotransmisor glutamato del tipo NMDA (5).

La excitotoxicidad tiene un papel central en la patología cerebrovascular, pero también en situaciones de trauma agudo y diversas enfermedades neurodegenerativas (6). No obstante, debido a la estrecha ventana de acción de los recursos terapéuticos existentes, se hace necesario establecer nuevas estrategias de investigación básica para poder profundizar en los aspectos fisiopatológicos y farmacológicos de la enfermedad vascular cerebral isquémica (7,8). Debido a las limitaciones técnicas y éticas que dificultan el estudio fisiopatológico de los fenómenos de isquemia cerebral en muestras de tejido humano, muchas de las hipótesis clínicas en esta área del conocimiento se utilizan mode-

los experimentales de isquemia cerebral en animales para abordarlas (9).

Entender el rol de varios factores patógenos intrínsecos y extrínsecos del daño isquémico representa un objetivo primordial en estudios de lesión cerebral isquémica; para esto, los modelos experimentales de isquemia cerebral se usan ampliamente en el mundo (10-15). Aunque se utilizan diversos tipos de especies, los roedores, especialmente las ratas, tienen una amplia aceptación, ya que ofrecen varias ventajas: como el bajo costo y debido a su pequeño tamaño, facilidad para la manipulación, menor gasto en los suministros de investigación, relativa homogeneidad genética y rapidez en la procreación, similitud importante con la anatomía y fisiología cerebrovascular del hombre al comparar con otras especies, como hámsteres, perros o gatos (16-19), y gran aceptación en los aspectos ecológicos y éticos (18).

En consecuencia, el objetivo de esta revisión es describir brevemente el modelo de isquemia cerebral focal mediante la técnica de filamento intraluminal en roedores y su importancia en el campo de la investigación básica, especialmente las neurociencias y los procesos neurodegenerativos.

MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL (ICF) CON OCLUSIÓN DE LA ACM EN RATAS

La isquemia cerebral focal con filamento intraluminal en ratas constituye un modelo óptimo y reconocido para valorar los mecanismos que sobre la supervivencia neuronal pueden ejercer diferentes sustancias. El modelo de isquemia cerebral focal con oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (ACM) (12), que ha dado apoyo a varios

grupos (20) ocasiona una lesión frontoparietal cortical y dorsolateral del estriado, y permite evaluar fenómenos de estrés celular en el foco isquémico o en áreas de oligemia o penumbra como el hipocampo o el sector medial del estriado (21, 22).

Uno de los aspectos más importantes del modelo de lesión vascular focal consiste en que permite evaluar cambios a distancia, no isquémicos (23-25). La Sustancia Negra Reticulata (SNr) es un discreto sector del sistema nervioso central no irrigado por la ACM, pero que presenta importantes cambios exo-focales como consecuencia de la isquemia del territorio de la ACM; se ha observado que después de inducir la lesión en el territorio de la arteria en mención, en el lapso de tres días el 47.7 % de neuronas de la SNr desaparece por mecanismos relacionados con excitotoxicidad glutamatérgica (26, 24). Se ha descrito que este cambio obedece a un desequilibrio entre los procesos de excitación e inhibición; en la SNr: la lesión corticoestriatal por lesión del territorio de la ACM ocasiona una amputación de las vías gabaérgicas estriatonigrales y palidonigrales, lo que ocasiona un predominio de la actividad glutamatérgica proveniente de las aferencias corticales y subtalámicas (27).

Varios investigadores se han esforzado en crear modelos de isquemia cerebral focal en ratas y ratones sin craneotomía y con posibilidad de reperfusión vascular; en los últimos años estos modelos constituyen una importante estrategia de investigación de la lesión vascular cerebral (10, 11, 13, 28, 29). La técnica con la que se logra fue desarrollada inicialmente en ratas de forma simultánea en 1989 por Longa y colaboradores y por Nagasawa y Kogure (11-13); ambos grupos se basaron en el modelo experimental en

ratas propuesto por Koizumi y colaboradores (1986). En términos generales, la técnica consiste en introducir por vía cervical, a través de la ACI, un monofilamento de nylon que alcanza el origen de la ACM; más tarde, dependiendo del tiempo que se determine, el nylon se retira del lecho arterial, lo que permite la reperfusión vascular.

La técnica de Longa et al. (1989) ha sido complementada por Belayeb et al. (11-13), quienes comprobaron que al recubrir el nylon con poli-l-lisina, un polímetro catiónico, se incrementaba la adhesión del nylon al endotelio vascular de naturaleza aniónica, lo que genera un infarto de mayor tamaño y con menor variabilidad entre los diferentes especímenes. Nagasawa y Kogure desde su descripción original de la técnica recubren el nylon con silicona mezclada con una sustancia "endurecedora" que podría producir un mecanismo similar de adhesión del filamento al endotelio vascular, como lo propuesto por Belayeb (12).

FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

La oclusión aguda de una de las mayores arterias cerebrales como la ACM produce una inmediata reducción del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente (isquemia focal), la reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el sector comprometido y puede cambiar en minutos u horas, especialmente cuando se instaura la reperfusión (29). La isquemia se torna severa en el denominado foco isquémico: en la periferia de este se establece un anillo denominado área de penumbra, en el cual la disminución del flujo es menos grave gracias a los aportes sanguíneos de las colaterales arteriales del tejido adyacente no isquémico (30).

El impacto de la isquemia cerebral depende de la severidad y la duración de la reducción del flujo sanguíneo. La isquemia poco severa pero prolongada produce cambios equivalentes a una isquemia corta y grave, sin embargo, se ha determinado que fenómenos moleculares como la inhibición de la síntesis proteica es la misma sin importar la duración de la isquemia (31).

Cuando la obstrucción arterial cesa se desencadena una fase de incremento del flujo sanguíneo en el territorio isquémico, el cual se ha denominado hiperemia postisquémica, que se sigue de un periodo más prolongado de hipoperfusión postisquémica (32). La reperfusión postisquémica no se logra completamente, por lo general quedan parches de tejido en los cuales no se vuelve a restablecer el flujo sanguíneo, lo que se ha denominado fenómeno de no reflujo, el cual es más destacado entre más prolongada sea la isquemia; este fenómeno de no reflujo se corresponde con los sitios de necrosis tisular.

La muerte celular en la isquemia puede suceder de distintas maneras; la más común, descrita en los tratados clásicos, es la muerte necrótica, también denominada oncosis o necrofanerosis (33, 34), que resulta de la falla energética aguda con pérdida de la morfología celular, desequilibrio iónico y finalmente lisis con desencadenamiento de procesos inflamatorios (35, 36). Por otro lado, puede observarse la muerte apoptótica o muerte celular programada, en la cual se activan mecanismos intracelulares dependientes de energía que llevan a una degradación regulada de la célula que más tarde es eliminada por células fagocíticas sin desencadenar reacción inflamatoria (37-39). En la isquemia cerebral aguda se generan los dos tipos de muerte celular, pero hay confusiones debido

a que el proceso necrótico puede ocasionar también la activación de enzimas proteolíticas características de la vía apoptótica.

Muchos otros procesos tienen repercusión en el daño final del tejido; entre estos se encuentra la liberación de citoquinas (40-41), la activación de proteasas de serina (42), la diferente vulnerabilidad a la isquemia de algunos grupos neuronales (por ejemplo, el sector CA1 del hipocampo, las láminas III y V de la corteza y el estriado son más sensibles a la isquemia) (43, 44) y los fenómenos de tolerancia isquémica desencadenados por episodios previos de isquemia (Precondicionamiento) (45).

ANATOMOPATOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA

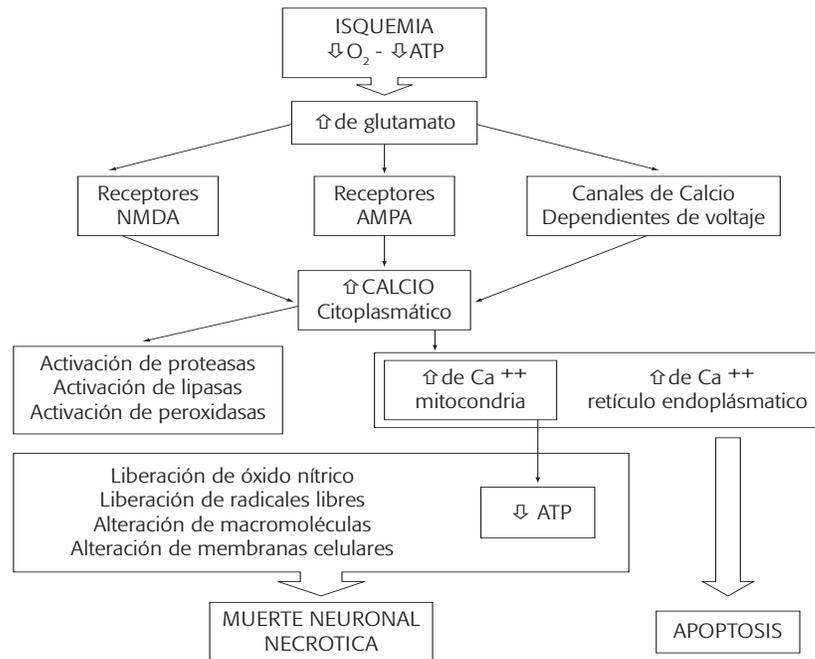
Los infartos cerebrales se definen como áreas de necrosis que se desarrollan en sitios donde ha ocurrido isquemia severa, la morfología es variada, y puede consistir en infartos isquémicos o hemorrágicos (40). El infarto hemorrágico es consecuencia de la reperfusión postisquémica principalmente tardía; 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 (41). La isquemia severa se asocia con áreas de infarto completo con necrosis tisular, edema e inflamación; con el transcurso de las horas el tejido se licua y se generan soluciones de continuidad; a este fenómeno se le denomina necrosis colicuativa (44).

Desde el punto de vista histopatológico con tinción de hematoxilina y eosina, la primera alteración visible al microscopio de luz óptico ocurre aproximadamente a las 12 horas, teniendo en cuenta que esto depende

del modelo y del tiempo de oclusión utilizado; consiste en que las neuronas afectadas presentan un citoplasma eosinófilo con un núcleo contraído; a este fenómeno se le ha denominado alteración neuronal isquémica (neuronas rojas) (41). Horas después se observa edema celular, el núcleo se ve contraído e hipercromático (picnótico), sin nucléolo y desplazado a la periferia de la neurona. Más tardíamente hay ruptura de la membrana nuclear y destrucción del núcleo (cariolisis); además, la ruptura de la membrana celular histológicamente se observa como sectores de intensa reacción basófila con pérdida de la morfología celular (42). En la corteza cerebral el proceso es diseminado, aunque no totalmente uniforme, se observan grupos de células lesionadas en las proximidades de neuronas normales (44).

FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR DE LA ISQUEMIA

La isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo que se inician con la falla energética relacionada con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit en la producción de adenosin trifosfato (ATP). La interrupción de los gradientes iónicos transmembranales debido a fallas en la bomba de sodio-potasio ATPasa y otras bombas iónicas dependientes de energía son el punto fundamental relacionado con los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia, y especialmente de la muerte celular en el foco isquémico si la obstrucción vascular se prolonga por unos minutos (46). Las neuronas y células gliales se despolarizan exageradamente por la entrada de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma (47), además sale potasio, y debido a este se produce un incremento inusitado de potasio extracelular (48).



Fuente: Arango-Dávila y cols. 2004.

Figura 1. Secuencia fisiopatológica como consecuencia de un infarto cerebral. Obsérvese que el incremento intracelular de calcio está implicado tanto en los fenómenos de muerte neuronal necrótica como en los fenómenos de muerte celular programada o apoptosis.

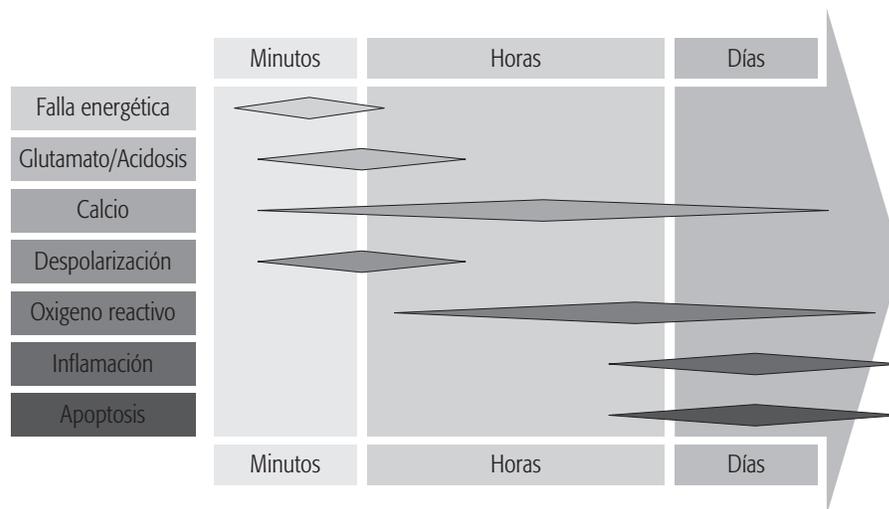


Figura 2. Secuencia temporal aproximada de los mecanismos asociados al daño en la isquemia cerebral focal.

La falla energética y los cambios iónicos asociados ocasionan un incremento de glutamato, una sobreexcitación de receptores glutamatérgicos, tanto de N-metil-D-aspartato (NMDA) ionotróficos y metabotróficos, como de receptores de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionico (AMPA), lo que confluye en un incremento aun mayor de calcio intracelular (figuras 1 y 2) (49, 50). Este incremento de calcio intracelular no depende exclusivamente de la activación de receptores de glutamato sino de la estimulación de canales de calcio dependientes de voltaje (50). La sobreexcitación ocasiona el fenómeno de despolarización periinfarto, la cual incrementa el gasto energético, especialmente cuando la membrana intenta repolarizarse (51, 30, 52).

El incremento de calcio, aunado a la acidosis y a la despolarización periinfarto, contribuyen a la iniciación del daño; más tarde, la inflamación y la activación de fenómenos apoptóticos contribuyen a incrementar la lesión (37). Por otro lado, durante la isquemia, y especialmente durante la reperfusión, se generan radicales libres, entre los que se incluye el óxido nítrico (NO). Estas moléculas altamente reactivas se producen en estados iniciales y tardíos de la isquemia cerebral mediante mecanismos fisiopatológicos diferentes: primeramente, las especies reactivas de oxígeno se producen por el metabolismo del ácido araquidónico y la oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS); en estados intermedios, los radicales libres de oxígeno son el aporte correspondiente a la infiltración de neutrófilos en el área isquémica; en estados más tardíos interviene la síntesis y activación de las enzimas oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (53, 54).

La isquemia cerebral desencadena una serie compleja de hechos moleculares, entre los cuales se encuentra la activación y expresión de genes. Algunos de estos fenómenos parten de la reacción inmediata de la neurona a la injuria (55); otros se asocian a procesos celulares que determinan el destino próximo de la neurona comprometida (56), y otros coordinan los mecanismos de la reparación de la neurona y los tejidos (57, 58).

Entre otros fenómenos moleculares reconocidos durante el proceso isquémico se encuentran la activación de genes de expresión rápida (IEG) (55), la inducción de genes de proteínas de choque térmico (HSP) (56), la activación de genes relacionados con: citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión celular (59), inducción de genes de las enzimas iNOS y COX-2 (53), inducción de genes de productos relacionados con la muerte celular programada (60) e inducción de genes relacionados con factores de crecimiento (57, 58).

IMPLICACIONES PARA LA INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIA

Desde mediados de los 80, los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) se han implicado en el desarrollo de varios trastornos neurológicos y psiquiátricos, además de ser reconocidos como uno de los principales mediadores de lesión tras isquemia cerebral (61). De ahí el gran interés que ha despertado conocer su rol en los fenómenos de muerte-reparación después de isquemia cerebral experimental. Los NMDARs son canales de calcio regulados por voltaje y por ligando con varias subunidades, cuya activación genera un flujo neto de iones de calcio. Debido a su rol mediador en los procesos de excitotoxicidad (62, 63), la hipótesis excitotóxica plantea que la excesiva estimulación de los receptores

NMDA puede desencadenar muerte celular (64). Este proceso puede ser responsable de varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, la lesión cerebral isquémica, epilepsia y esquizofrenia (65). Los estudios con radioligandos indican que los receptores de NMDA se encuentran densamente distribuidos en la corteza cerebral, hipocampo, estriado y la amígdala (66). El daño de esas áreas resultará en alteraciones cognitivas y emocionales (67). De hecho, hay evidencia científica desde hace más o menos una década que demuestra que la acumulación cerebral de ácido glutámico, así como su excitotoxicidad, también juegan un importante rol en la génesis del trastorno depresivo (68) (69).

CONCLUSIONES

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 subyacentes al infarto isquémico, especialmente por su similitud con la lesión humana. Este modelo experimental de isquemia cerebral en ratas ha permitido a varios grupos de investigación en el mundo adelantar estudios sobre los mecanismos de lesión neuronal y generar nuevas hipótesis sobre los procesos neurodegenerativos cerebrales. Se espera que con la aplicación de la biología molecular y la genética en el estudio de la lesión cerebral isquémica se aumente la comprensión de la fisiopatología y se logre importantes avances en el fundamento del diseño y la aplicación de estrategias neuroprotectoras que puedan ser llevadas a ensayos clínicos y finalmente ayuden en la disminución de la muerte y la discapacidad de los pacientes con lesión isquémica.

Agradecimientos: A César Arango-Dávila (Ph.D) y Ana Carolina Londoño (MSc) por la instrucción en el modelo de isquemia cerebral focal y aportes conceptuales significativos para escribir este artículo.

Conflictos de interés: Este artículo se escribió cuando Carlos Cassiani se desempeñaba como docente de la Universidad Santiago de Cali, dentro de las actividades de investigación formativa en el Grupo de Investigación en Salud Pública (GISAP).

Financiación: Universidad Santiago de Cali.

REFERENCIAS

1. Morgenstern LB, Smith WS. Setting priorities for stroke care and research. *Int J Stroke* 2013 Aug; 8(6): 445 - 6.
2. Leiva GMA, Santibañez DA, Ibarra E S, Matus CP, Seguel R. A five-year study of particulate matter (PM2.5) and cerebrovascular diseases. *Environ Pollut* 2013;181:1- 6.
3. Pradilla AG, Vesga A BE, León-Sarmiento FE, Rosseli DA, Bautista LE, Morillo L et al. [National neuroepidemiological study in Colombia (EPINEURO)]. *Rev Panam Salud Pública* 2003; 14(2):104 -11.
4. Ministerio de Protección Social-Universidad Nacional de Colombia. Situación de salud en Colombia, 2005. Informe preliminar.
5. Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10(7):644-54.
6. Schulte EC, Slawik H, Schüle R, Gunther T, Hüll M. Alterations in excitotoxicity and prostaglandin metabolism in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2009; 55(7):689 - 96.
7. World Health Organization. Task Force on Stroke preventions and other Cerebrovascular Disorders: recommendation on stroke

- preventions, diagnosis and therapy. *Stroke* 1989; 20 :1407-1431.
8. Prasuja V, Gusain A, Mehta SL, Raghubir R. Molecular Mechanisms of Apoptosis in Cerebral Ischemia: Multiple Neuroprotective Opportunities. *Mol Neurobiol* 2008; 37:7- 38.
 9. Drzyzga LR, Marciniowska A, Obuchowicz E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull* 2009; 79(5):248 - 57.
 10. Belayeb L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. J occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke* 1996; 27:1616 -1623.
 11. Belayeb 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. 1997a; 17: 1266-1280.
 12. 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. 1997b: 17, 1281-1290.
 13. Belayeb L, Busto R, Zhao W, Fernández G, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* 1999; 833:181-190.
 14. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20:84 - 91.
 15. Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery without craniectomy in rats : which method work best ? *Stroke* 1993; 24:294 - 298.
 16. Holland JP, Sydserff S, Taylor W, Bell A. Rat model of middle cerebral artery ischemia. Letters to editor. *Stroke* 1993; 24:1423 -1424.
 17. Molinari GF., Laurent JP. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 1976; 7:14 -17.
 18. Ginsberg MD, Bustos R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20:1627-1642.
 19. Ginsberg MD. On Ischemic Brain Injury in Genetically Altered Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1999; 19: 2581-2583 43.
 20. Arango-Dávila CA, Cardona-Gómez GP, Escobar M, Pimienta HJ. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: Fundamental Aspects and its Projection on Clinical Practice. *Rev Neurol* 2004; 39(2): 156-165.
 21. Garcia-Galloway E, Arango C, Pons S, Torres-Aleman I. Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I pro-survival signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2003, 24: 1027-1037.
 22. Cardona-Gómez GP, Arango-Dávila CA, Escobar M, Pimienta HJ. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: Fundamental Aspects and its Projection on Clinical Practice. *Rev Neurol* 2004, 39(2): 156 -165.
 23. Arango C, Pimienta H, Escobar M. Depresión postisquemia cerebral: aproximación clínica y fisiopatológica. *Revista Colombiana de Psiquiatría* 2000; 4: 321- 344.
 24. Arango-Dávila CA, Cardona-Gómez GP, Escobar M, Pimienta HJ. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: Fundamental Aspects and its Projection on Clinical Practice. *Rev Neurol* 2004, 39(2): 156 -165.
 25. Arango-Dávila CA, Escobar M, Buriticá E, Pimienta HJ. Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental. Una visión experimental y su correlato clínico. *Colomb Med* 2008; 39 (Supl 3): 85- 85.
 26. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989; 20:1037-1043.
 27. Nakayama H, Tamura A, Kanazawa I, Sano K. Time-sequential change of amino acid neurotransmitters -GABA, aspartate and glutamate- in the rat basal ganglia following middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res* 1990; 12(4):231-5.
 28. Osborne K, Shigeno T, Balarsky A, Ford I, McCulloch J, Teasdale G, Graham D. Quantitative assessment of early brain damage in

- a rat model of cerebral ischaemia. *J of Neurol Neuropsychy and Psychiatry* 1987; 50: 402- 410.
29. Zhao W, Belayeb L, Ginsberg D. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: neurological deficit, and pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization. *J cereb blood flow and metabolism* 1997; 17: 1281-1290.
 30. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra- Revision of a concept. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1998; 18: 621-638.
 31. Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;5 753 - 61.
 32. White BC, Sullivan JM, De Gracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000;179(S 1-2):1-33.
 33. McDonald E, Windeback A. Mechanism of neurotoxic injury and cell death. *Neurologic Clinic* 2000; 16: 1-7.
 34. Robinson RG. Poststroke depression: prevalence, diagnosis, treatment, and disease progression. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 376 - 38730.
 35. Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule -1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metad* 1995; 15:42-51.
 36. Kondo Y. Activated and fagocytic microglía. Cerebral Ischemia: molecular and cellular pathophysiology. Totowa, NY: Humana Press Inc.; 1999. p. 251-269.
 37. Banasiak K, Xia Y, Haddad G. Mechanism's underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Haddad Progress in Neurobiology* 2000; 62:3:215-249.
 38. Abdelhaq R, Rachna A, Giovannina B, Jürgen W. 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.
 39. Tetsumori Y. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in Neurobiology* 2000; 62 (3):273 - 295.
 40. Relton J, Beckey V, Hanson W, Whalley E. CP-0597 a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1997; 28: 1430 -1436.
 41. Turrin N, Plata-Salaman C. Cytokine-cytokine interaction and the brain. *Neurobiol* 2000; 51: 3-9
 42. Gingrich M, Traynelis S. Serine proteases and brain damage – contribution of the urokinase-plasminogen activator. *Trends in Neurosciences* 2001;24 (1):8 - 9.
 43. Freund HJ. Differential effects of cortical lesions in humans. *Ciba Found Symp* 1987; 132:269 - 281.
 44. Araki T, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand* 1989; 80 (6): 548 - 53.
 45. Shamloo M, Kamme K, Wieloch T. Subcellular distribution and autophosphorilation of calcium/calmodulin-dependent protein kinasa II in rat hippocampus in a model of ischemic tolerance. *Neuroscience* 2000; 96: 665 -74.
 46. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977; 8 (1): 51-7.
 47. Hansen A. Effec of anoxia onion distribution in the brain. *Physiol Rev* 1985; 65: 101-148.
 48. Blank WF, Kirshner HS. The kinetics of extracellular potassium changes during hypoxia and anoxia in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1996; 123:113-124.
 49. Choi D. Ionic dependence of glutamate toxicity. *J Neurosci* 1997; 7: 369-379.
 50. Choi D, Rothman S. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic/ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 1990; 13: 171-182.

51. Choi D. Excitotoxic cell Death. *Journal of Neurobiology* 1992; 23: 1261-1276.
52. Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Domann R, Kraemer M, Witte OW. Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(5):906-14.
53. Grandati M, Verrecchia C, Revaud ML, Allix M, Boulu RG, Plotkine M. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 1997;122 (4): 625 -30.
54. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997;17 (8): 2746-55.
55. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke* 1996;9 1682-7.
56. Massa SM, Swanson RA, Sharp FR. The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996 (Summer); 8 (2): 95-158.
57. Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996; 27 (10): 1865-72; discussion 1872-3.
58. Koistinaho J, Hokfelt T. Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 1997; 8 (2): I-VIII.
59. Kim DH, Li H, Yoo HL, Lee BH, Hwang IK and Won MH. Effects of fluoxetine on ischemic cells and expressions in BDNF and some antioxidants in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia. *Experimental Neurology* 2007; 204: 748 - 758.
60. MacManus JP, Linnik MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17 (8): 815 - 32.
61. Gaspar PA, Bustamante ML, Silva H, Aboitiz F. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. *J Neurochem* 2009; 111(4):891- 900.
62. Rebola N, Srikumar BN, Mulle C. Physiol Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 2010 Jan 1; 588(Pt 1):93 - 9.
63. Biblioteca Virtual para la Vigilancia en Salud Pública de Colombia. Consultado en: <http://www.bvs-vspcol.bvsalud.org/cgi-bin/wxis.exe/iah/>
64. Xu J, Kurup P, Zhang Y, Goebel-Goody SM, Wu PH, Hawasli AH et al. Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 2009;29(29):9330 - 43.
65. Labrie V, Roder JC. The involvement of the NMDA receptor d-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 2010 ;34(3):351-72.
66. Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* 2009;158(1):334 - 43.
67. Zhang Y, Behrens MM, Lisman JE. Prolonged exposure to NMDAR antagonist suppresses inhibitory synaptic transmission in prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 2008;100(2):959 - 65.
68. Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci* 2009 Nov; 30(11):563 - 9.
69. Gladding CM, Fitzjohn SM, Molnár E. Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long-Term Depression: Molecular Mechanisms. *Pharmacol Rev* 2009;61(4):395-412.