

Daño Cerebral Hipóxico-Isquémico en Ratas de 7 Días de Edad: Alteraciones Neurológicas Tempranas y Lesiones Permanentes

ARTURO OTA¹, TOMOAKI IKEDA¹, HIROSHI SAMESHIMA¹, TSUYOMU IKENOUE¹ y KIYOTAKA TOSHIMORI²
¹Departamento de Ginecología y Obstetricia. ²Departamento de Anatomía. Escuela de Medicina de Miyazaki, Japón.

RESUMEN

OBJETIVOS: Observar las diferencias de vulnerabilidad de las diferentes regiones cerebrales frente a la hipoxia isquemia (HI), y la inducción de la síntesis de marcadores de injuria neuronal y su efecto posterior en la neurona. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se ligó la arteria carótida izquierda a ratas de 7 días de edad, seguido de 2 h de hipoxia, sacrificándolas a diferentes intervalos de tiempo. Se realizó un estudio inmunohistoquímico con la proteína del golpe del calor de 72 kDa (HSP72) y la proteína asociada al microtúbulo tipo 2 (MAP2) durante las primeras 72 h. **RESULTADOS:** La pérdida de inmunotinción del MAP2 se observó desde la 1 h, siendo máxima a las 24 h, pero a las 72 h se observó una reaparición en la mayoría de regiones del hemisferio izquierdo, excepto la región CA3 del hipocampo. Entre 1 y 2 semanas después se observó lesiones de tipo atrófico y cístico. 15-20% de ratas no sufrió daño anatómico hasta las 4 semanas. Hubo síntesis temprana de HSP72 en el giro dentado del hipocampo, mientras que en la región CA3 su inducción fue tardía, observándose aquí mayor vulnerabilidad a la HI. **CONCLUSIONES:** En 15 a 20% de ratas sometidas a HI no se observa daño anatómico hasta las 4 semanas. La lesión atrófica o cística se consolida entre 1 y 2 semanas después del insulto, a pesar de una aparente recuperación inmunohistoquímica a las 72 h.

Palabras claves: Lesión Cerebral Crónica; Anoxia Cerebral; Isquemia Cerebral; Inmunohistoquímica.

HYPOXIC-ISCHEMIC BRAIN DAMAGE IN 7-DAYS-OLD RATS: EARLY NEURONAL CHANGES AND THE LONG-TERM OUTCOME SUMMARY

OBJECTIVES: To study the changes after hypoxia-ischemia (HI), and to observe both, the vulnerability of the different regions of the brain to HI and the heat shock protein-72 kDa (HSP72) induction and its effects on the neuronal cell. **MATERIAL AND METHODS:** 7-days-old rats were exposed to left carotid artery ligation followed by 2 h of HI and then they were sacrificed at different time points. Brains extracted at 1-72 h were immunohistochemically study using the HSP-72 and the microtubule associated protein-2 (MAP2) stainings. Brains extracted at 1-4 weeks underwent histopathological study. **RESULTS:** Loss of MAP2 immunostaining was detected since the 1st hour post-insult, being highest at 24 h. MAP2 reappeared at 72 h in almost all the brain regions of the ligated hemisphere, except the hippocampal CA3 region. At 1-2 weeks post HI, we observed atrophic and cystic lesions. 15-20% of rats did not show any anatomical lesion up to 4 weeks post HI. The HSP72 synthesis was early in the dentate gyrus of the hippocampus, but a delayed induction was observed in the CA3 region; this region showed an increased vulnerability to HI. **CONCLUSIONS:** Absence of anatomical lesion was observed in 15-20% of rats exposed to HI. Atrophic or cystic lesions are observed since 1-2 weeks after the insult, despite an apparent immunohistochemical recovery at 72 h.

Key words: Brain Damage, Chronic; Cerebral Anoxia; Cerebral Ischemia; Immunohistochemistry.

Correspondencia:

Dr. Arturo Ota Nakasone
Servicio de Neonatología
Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins
Av. Edgardo Rebagliati s/n Jesúa María. Lima 11, Perú.

INTRODUCCIÓN

El daño cerebral hipóxico-isquémico en el período perinatal sigue siendo una de las causas que se menciona como prevalentes de secuelas neurológicas en niños (1). A pesar de su importancia, poco se conoce aún sobre los mecanismos fisiopatológicos de esta entidad.

El cerebro de la rata de 7 días de edad constituye un modelo adecuado para estudiar los mecanismos fisiopatológicos del daño hipóxico-isquémico perinatal, ya que su madurez cerebral se correlaciona con el del ser humano a término (2).

La preparación de Levine (3) modificada para ratas inmaduras (4), que consiste en la ligadura unilateral de la arteria carótida común seguida de exposición a hipoxia, ha sido empleada para estudiar el efecto de la hipoxia-isquemia en cerebro de ratas recién nacidas. En este modelo experimental, el daño neuronal está usualmente confinado al lado ipsilateral de la ligadura, y el lado contralateral puede ser usado como "control".

La región del hipocampo ha sido reportada como una de las zonas más vulnerables a la isquemia o la hipoxia-isquemia, tanto en modelos experimentales de roedores adultos (5) y recién nacidos (6), así como en seres humanos. Por otro lado, debido a sus características anatómicas, el hipocampo se constituye en una región adecuada para estudiar la secuencia de eventos fisiopatológicos que ocurren luego de un insulto hipóxico o isquémico (5). Por estas dos razones elegimos el área cerebral que contiene al hipocampo para nuestro estudio.

Dada nuestra intención de estudiar los cambios neurológicos en el cerebro desde las primeras horas posteriores al insulto hipóxico-isquémico, utilizamos dos tipos de "marcadores de injuria neuronal": la proteína del golpe de calor de 72 kDa (*heat shock protein 72kDa*, HSP72) y la proteína asociada al microtúbulo tipo 2 (*microtubule-associated protein 2*, MAP2). Las proteínas del golpe de calor son un conjunto de proteínas sintetizadas en respuesta a una serie de estímulos nocivos tales como: hipertermia (7), isquemia (8), hipoxia-isquemia (9), trauma, etc.

Las proteínas asociadas al microtúbulo son proteínas estructurales del citoesqueleto neuronal, que actúan como "puentes" de los microtúbulos e involucradas en el mantenimiento de la morfología neuronal (10). El

MAP2 se localiza exclusivamente en las dendritas y soma del cuerpo neuronal. Estímulos nocivos como la isquemia o la anoxia producen la pérdida de la inmunotinción del MAP2, y este hecho es considerado como un evento precoz de injuria neuronal (11).

El presente trabajo tiene por objetivo hacer algunas precisiones luego del análisis de varias investigaciones realizadas por el autor en relación al tema (12,13), centrándose especialmente en los siguientes puntos:

- Estudio de la secuencia de cambios neuronales que ocurren en la corteza cerebral de rata desde las primeras horas hasta el mes posterior al insulto hipóxico-isquémico.
- Diferencias de vulnerabilidad de las diferentes regiones cerebrales frente al insulto.
- La inducción de la síntesis de la proteína del golpe de calor de 72 kDa y su efecto posterior en la célula neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en los laboratorios de la Escuela de Medicina de Miyazaki (Japón) con la aprobación del Comité de Investigación en Animales de la Universidad.

Se utilizó ratas del género Wistar nacidas de parto espontáneo y amantadas por la madre hasta el día del experimento. Un total de 151 animales fueron usados, 128 experimentales y 23 ratas de control.

Modelo experimental

Se empleó la preparación de Levine modificada. A los 7 días de nacida (día del nacimiento = día 0) se realizó la sección de la arteria carótida izquierda usando un microscopio estereoscópico. Luego de un período de reposo entre 0,5 y 2 horas, las ratas fueron expuestas durante dos horas en una cámara de hipoxia (8% de oxígeno y 92% de nitrógeno). La temperatura dentro de la cámara se mantuvo en 33°C (que es el ambiente térmico usual para la rata de esta edad, cuando está en contacto con su madre) (14). En cuatro animales se colocó un termosensor (Modelo PTN 100, Unique Medical) conectado a un termómetro digital (Modelo PTC 201, Unique Medical) para medir la temperatura

a nivel del músculo temporal (medición indirecta de la temperatura cerebral). Al final del período hipóxico, los animales fueron retirados de la cámara de hipoxia y luego de un período de observación de 15 a 30 minutos, nuevamente colocados con su respectiva madre.

Las ratas se sacrificaron en los siguientes tiempos: 1 hora (n = 16), 24 horas (n = 18), 72 horas (n = 20), 1 semana (n = 20), 2 semanas (n = 21), 3 semanas (n = 15) y 4 semanas (n = 18) después del experimento.

Animales de control

Éstos constituyeron tres subgrupos de controles:

- Ratas con ligadura de la arteria carótida común izquierda sin exposición a la hipoxia (n = 6). Éstas fueron sacrificadas a las 24 horas (n = 3) o a los 7 días posteriores a la ligadura (n = 3).
- Ratas con 2 horas de exposición hipóxica (8% oxígeno y 92% nitrógeno) sin ligadura de la arteria carótida (n = 10). Igualmente fueron sacrificadas a las 24 horas (n = 6) o a los 7 días posteriores a la hipoxia (n = 4).
- Ratas no tratadas (n = 7), sacrificadas a los 8 días de edad (n = 4) o a los 14 días de edad (n = 3).

Estudio inmunohistoquímico

Se realizó en animales sacrificados entre 1 y 72 horas posteriores al insulto. Debido a consideraciones técnicas, los animales destinados al estudio de HSP72 fueron sacrificados por perfusión-fijación transcardíaca de paraformaldehído al 4%, a través del ventrículo izquierdo, usando una bomba peristáltica. Los cerebros fueron extraídos y fijados en el mismo fijador ya mencionado. Las muestras se conservaron en congelación.

Los animales destinados a estudio de MAP2 fueron sacrificados por decapitación y los cerebros fijados en solución de etanol y ácido acético 19:1. En este caso las muestras fueron embebidas en parafina.

Tanto la inmunotinción del HSP72 como el MAP2 se realizó por el método ABC (Avidin-Biotinylated peroxidase Complex) ^(12,15) usando el equipo de ABC-Vectastain Elite (Vector Laboratories).

Se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-HSP72 (Amersham, RPN1197) y el anti-MAP2

(Chemicon International) diluidos en buffer 1:200 en ambos casos. El tiempo de incubación fue 12 horas para el HSP72 y 30 minutos para el MAP2. Luego las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:200 durante 3 horas para el HSP72 y 30 minutos para el MAP2. Posteriormente, fueron tratadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos. Finalmente, la inmunorreacción se visualizó con el DAB (3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorada) en presencia de peróxido de hidrógeno al 0,02%.

Estudio histopatológico

Se realizó en animales sacrificados a las 72 horas, 1, 2, 3 y 4 semanas después del insulto hipóxico-isquémico. Los cerebros fueron fijados en solución de etanol y ácido acético 19:1 y los especímenes embebidos en parafina.

La tinción se realizó con hematoxilina-eosina o violeta de cresyl.

Evaluación de los cambios inmunohistoquímicos y/o daño neuronal

A fin de poder evaluar comparativamente todas las muestras, las secciones coronales de cerebro se realizaron en todos los casos en el nivel A2.0mm de acuerdo al Atlas Estereotáxico de ratas inmaduras ⁽¹⁶⁾, que contiene en el corte a hipocampo dorsal. La observación se hizo con microscópico óptico, magnificación 400X.

Tanto los cambios inmunohistoquímicos (inducción de HSP72 o pérdida de inmunotinción de MAP2), como el daño neuronal, fueron evaluados en varias regiones cerebrales y clasificados en una escala de dos grados de intensidad o severidad: Leve-moderado = compromiso de menos del 50% del área estudiada; Severo = compromiso de más del 50% del área estudiada.

RESULTADOS

Animales de control

Ninguno de los animales de control presentó inducción de la síntesis de HSP72, tampoco pérdida de la inmunotinción de MAP2 ni alteración histopatológica alguna.

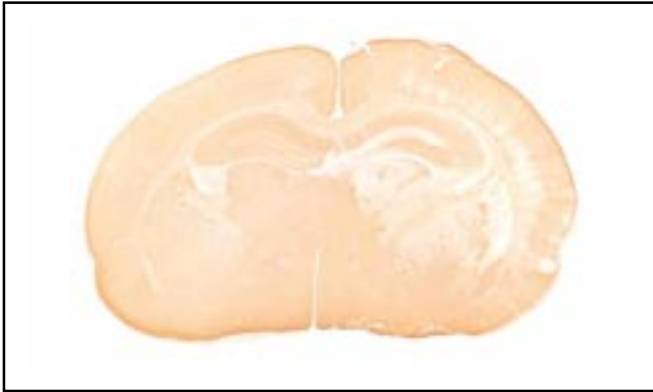


Fig. 1-A

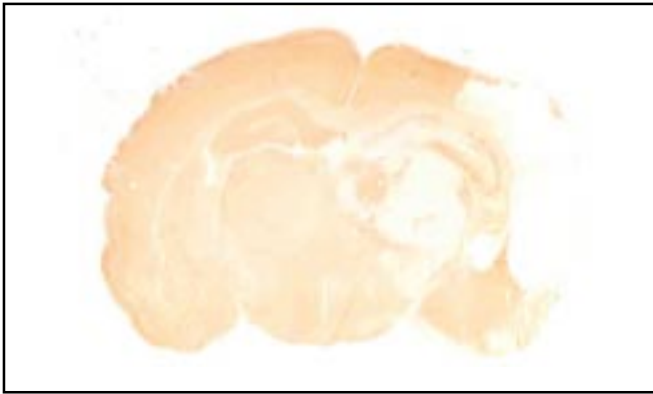


Fig. 1-B

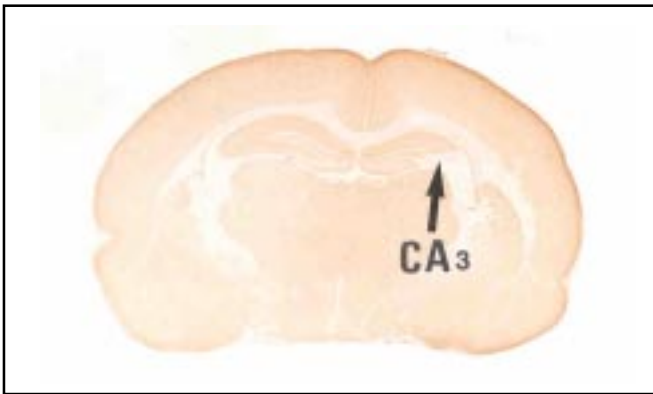


Fig. 1-C

Fig. N° 1.- Inmunotinción con MAP2 en cerebro de ratas sometidas a hipoxia-isquemia. (A) 1 hora después del insulto: se observa pérdida del MAP2 en el lado ligado (izquierdo) del cerebro. (B) 24 horas después del insulto: la pérdida del MAP2 está más extendida a través de todo el hemisferio izquierdo. (C) 72 horas después del insulto: se observa una recuperación de la inmunotinción del MAP2 en casi todas las regiones, excepto el CA3 del hipocampo. (Magnificación 8,5X).

Temperatura cerebral durante la hipoxia

Antes de la exposición a la hipoxia, la temperatura del músculo temporal fue $36,77 \pm 0,45^{\circ}\text{C}$. A la hora de la exposición hipóxica, la temperatura bajó a $35,35 \pm 0,65^{\circ}\text{C}$. Luego de finalizar la hipoxia, hubo una recuperación lenta de la temperatura hasta llegar a sus valores iniciales aproximadamente a la hora después del insulto.

Alteraciones neuronales tempranas en la corteza cerebral (evaluado con el MAP2)

La ausencia de la inmunotinción del MAP2 (como marcador de injuria neuronal) se observó desde la primera hora posterior al insulto. Esta pérdida del MAP2 se circunscribió al hemisferio ligado (izquierdo) del cerebro, mientras que el lado contralateral permaneció sin alteraciones (Fig. 1-A). A las 24 horas, más del 90% de ratas presentaron pérdidas extensas del MAP2 (Fig. 1-B). Sin embargo a las 72 horas hubo una recuperación de la inmunotinción perdida en diferentes regiones del cerebro, excepto en la región CA3 del hipocampo (Fig. 1-C).

La Tabla N° 1 muestra la incidencia y severidad de la pérdida del MAP2 desde la primera hasta las 72 horas posteriores al insulto.

Tabla N° 1.- Secuencia temporal de la pérdida del MAP2 en corteza cerebral expuesta a hipoxia-isquemia.

	Pérdida Severa del MAP2*	Pérdida Leve-Mod. del MAP2§	Inmunotinción de MAP2 normal
1 h (n = 16)	3	6	7
24 h (n = 18)	12	5	1
72 h (n = 20)	5†	10	5

* *Pérdida de la inmunotinción del MAP2 en más del 50% del área cortical de la sección examinada.*

§ *Pérdida de la inmunotinción del MAP2 en menos del 50% del área cortical de la sección examinada.*

† *p < 0,05 comparado con el grupo de 24 horas.*

Estudio histopatológico de la corteza cerebral

La incidencia y severidad del daño cortical entre las 72 horas y las 4 semanas posteriores al insulto se muestran en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2.- Daño cortical hipóxico-isquémico en ratas sacrificadas entre las 72 h y 4 semanas.

	Daño Severo*	Daño Leve Moderado [§]	Sin daño cortical
72 h (n = 20)	5	10	5
1 sem (n = 20)	11 [‡]	4	5
2 sem (n = 21)	10	8	3
3 sem (n = 15)	8	4	3
4 sem (n = 18)	8	7	3

* Pérdida neuronal que ocupa más del 50% del área cortical de la sección examinada.

[§] Pérdida neuronal que ocupa menos del 50% del área cortical de la sección examinada.

[‡] $p < 0,05$ comparado con el grupo de 72 horas.

El daño cortical se incrementó desde las 72 horas a la semana posterior al insulto, de un 25% a un 55% ($p < 0,05$). Después de la semana del experimento no hubo mayor deterioro del daño cerebral, diferenciándose más bien en dos patrones de daño:

- Lesión atrófica** (Fig. 2-A), que compromete tanto regiones selectivas (como la región CA3 del hipocampo) como también todo el hemisferio cerebral ligado.
- Lesión cística** (Fig. 2-B), pudiendo ser pequeñas y localizadas en la región parieto-occipital del lado ligado, como también grandes cavidades císticas que ocupan todo el hemisferio cerebral comprometido. Las lesiones císticas fueron las que más se encontraron, observándose en más del 50% de ratas sacrificadas.

Un 15-20% de ratas sacrificadas entre la semana y las 4 semanas posteriores al insulto no presentó daño cerebral alguno.



Fig. 2-A

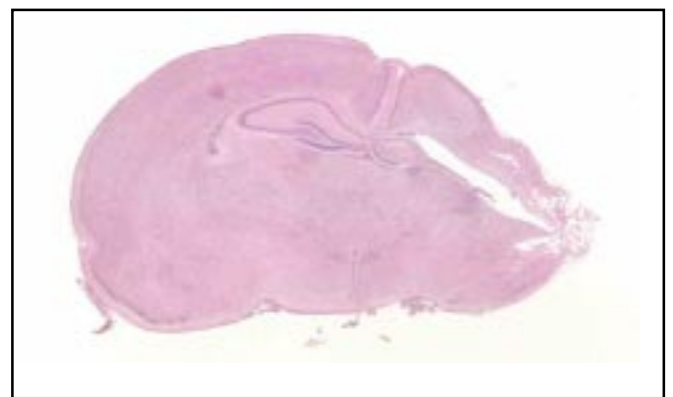


Fig. 2-B

Fig. N° 2.- Dos patrones del daño cerebral hipóxico-isquémico después de 1 semana del insulto. (A) Lesión atrófica: en este caso circunscrito en la región del hipocampo, sobretodo en las regiones CA1 y CA3; no hay compromiso cortical. (B) Lesión cística: se observa un infarto generalizado del hemisferio ligado, con una lesión cavitaria que se comunica con el ventrículo lateral dilatado. (Tinción: Hematoxilina-eosina; 8,5X).

Diferencias regionales de daño cerebral hipóxico-isquémico (a las 72 horas y 1 semana posterior al insulto)

La Tabla N° 3 muestra la incidencia y severidad del daño neurológico en diferentes regiones del hipocampo y corteza cerebral evaluada a las 72 horas y 7 días.

A las 72 h la región CA3 del hipocampo es la más vulnerable. Pero a los 7 d posterior a la hipoxia-isquemia, el daño cerebral ha aumentado, y siempre el hipocampo (sobre todo la región CA3) muestra la mayor vulnerabilidad. La Figura N° 3 muestra una sección con daño selectivo de la región CA3 del hipocampo.

Tabla Nº 3.- Vulnerabilidad regional del daño cerebral hipóxico-isquémico a las 72 h y 1 semana.

		Daño Severo*	Leve Moderado [§]	Sin Daño
Corteza	72 h	1 (8,3%)	6 (50,0%)	5 (41,6%)
	7 días	7 (43,7%)	3 (18,7%)	6 (37,5%)
Giro Dent.	72 h	0 (0%)	5 (41,6%)	7 (58,3%)
	7 días	6 (37,5%)	4 (25,0%)	6 (37,5%)
CA1 HIP.	72 h	0 (0%)	6 (50,0%)	6 (50,0%)
	7 días	9 (56,2%)	4 (25,0%)	3 (18,7%)
CA3 HIP.	72 h	6 (50,0%)	3 (25,0%)	3 (25,0%)
	7 días	11 (68,7%)	2 (12,5%)	3 (18,7%)

* Pérdida neuronal que ocupa más del 50% del área cortical de la sección examinada.

§ Pérdida neuronal que ocupa menos del 50% del área cortical de la sección examinada.

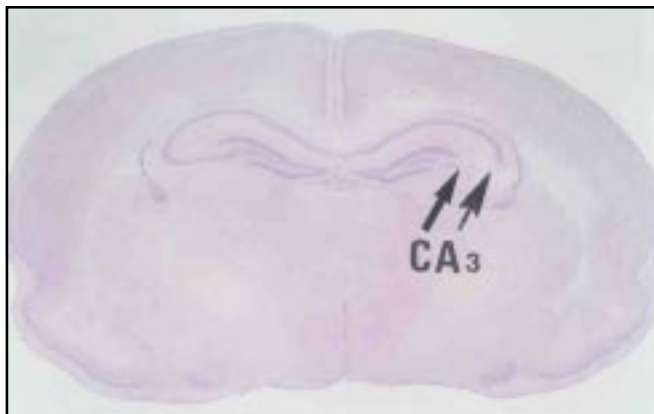


Fig. Nº 3.- Fotografía representativa del cerebro de rata con daño selectivo de la región CA3 del hipocampo (flecha). (Tinción: Hematoxilina-eosina; 8,5X).

Secuencia de la síntesis del HSP72 en la corteza cerebral y el hipocampo

El HSP72 es sintetizado tempranamente (1 hora posterior a la hipoxia-isquemia) en el giro dentado del hipocampo (Fig. 4-A). A las 24 horas hay una síntesis

Tabla Nº 4.- Secuencia temporal de la síntesis de HSP72 en cerebro de ratas expuestas a hipoxia-isquemia.

		1 hr	24 hrs	72 hrs
Corteza	Ind. Leve-mod.*	1	1	4
	Ind. Fuerte [§]	0	5	1
Giro Dent.	Ind. Leve-mod.	3	3	2
	Ind. Fuerte	0	2	0
CA1 HIP.	Ind. Leve-mod.	1	2	5
	Ind. Fuerte	0	4	1
CA3 HIP.	Ind. Leve-mod.	0	4	2
	Ind. Fuerte	0	2	4

* Neuronas HSP72 positivas en más del 50% de la superficie de la sección examinada.

§ Neuronas HSP72 positivas en menos del 50% de la superficie de la sección examinada.

Ind: Inducción de síntesis de HSP 72.

aumentada en las diferentes regiones del cerebro, pero aún poca inducción en la región CA3 del hipocampo (Fig. 4-B). A las 72 horas la inmunotinción del HSP72 disminuye ostensiblemente en todas las regiones excepto en el CA3 del hipocampo. Aquí persiste una gran inducción de esta proteína (Fig. 4-C).

La Tabla Nº 4 muestra una secuencia de la inducción del HSP72 de 1 a 72 horas posteriores al insulto.

DISCUSIÓN

La preparación de Levine como modelo experimental

Como observamos en los animales de control, el insulto hipóxico aisladamente no produjo daño cerebral, así como la ligadura de la arteria carótida sin el componente hipóxico. Es bien conocido que la hipoxia incrementa el flujo sanguíneo cerebral⁽¹⁷⁾. Asimismo la vascularización cerebral de la rata es muy semejante a la del ser humano con el sistema de redes arteriales del Círculo de Willis, razón por la cual la ligadura de la arteria carótida aislada no disminuye el flujo vascular cerebral del hemisferio ligado⁽¹⁸⁾.

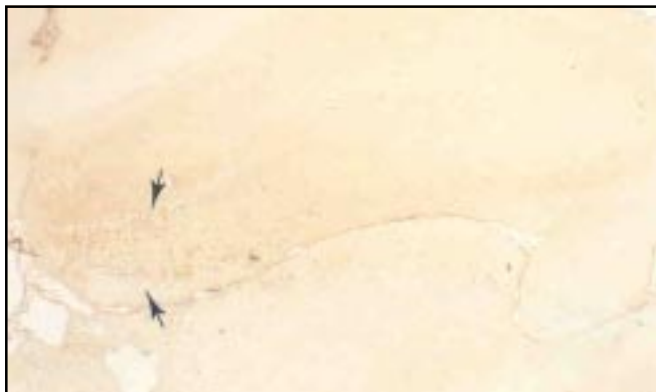


Fig. 4-A



Fig. 4-B

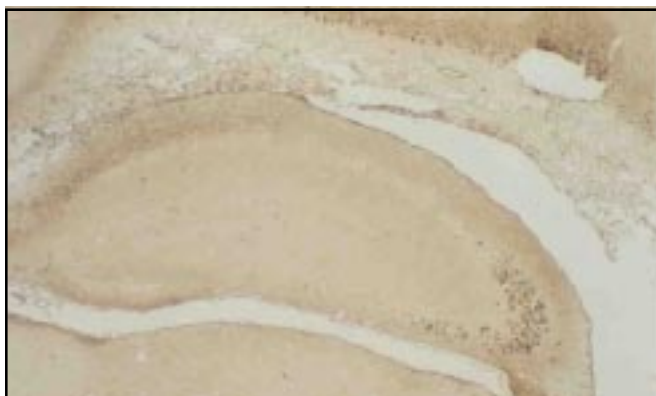


Fig. 4-C

Fig. Nº 4.- Síntesis del HSP72 en el hipocampo ipsilateral a la ligadura. (A) 1 hora después del insulto se observa una leve inducción en el giro dentado del hipocampo. (B) A las 24 horas el HSP72 es inducido en casi todo el hipocampo, pero en la región CA3 hay muy poca síntesis. (C) A las 72 horas posterior al insulto el CA3 presenta una fuerte inducción de HSP72, pero en las demás regiones ha disminuido ostensiblemente. (40X).

En cambio la combinación hipóxico-isquémica genera una redistribución sanguínea cerebral con la consiguiente disminución del flujo en diversas regiones del lado ipsilateral, siendo la causa del posterior daño cerebral.

Alteraciones reversibles e irreversibles del daño cerebral hipóxico-isquémico

Dentro de las primeras 72 horas luego del insulto hipóxico-isquémico se observó cambios reversibles en las neuronas cerebrales (evaluadas con el MAP2) en varias regiones cerebrales, excepto el CA3 del hipocampo. Posteriormente se produjo cambios que son de tipo irreversible, cuyo destino será la lesión atrófica o la cística, de acuerdo a la severidad del daño.

Estos dos tipos de injuria neuronal, reversible e irreversible, han sido también observados en experimentos con roedores adultos luego de ser sometidos a **leves episodios de isquemia** (sin una alteración significativa del estado energético ni la homeostasis). Cuando el insulto isquémico era más fuerte no se observaron las alteraciones reversibles. Nosotros también observamos que cuando las condiciones de hipoxia-isquemia se hacían más duras (p. ej., elevar la temperatura durante la hipoxia a 37°C), sólo observamos lesiones irreversibles desde las 24 horas posteriores al insulto.

El mecanismo para la desaparición temprana y transitoria del MAP2 no está claro. Es posible que sea sólo el reflejo de una pérdida de antigenicidad causada por algún factor como fosforilación de la proteína o un viraje a un pH ácido del tejido afectado ⁽¹¹⁾. La pérdida permanente del MAP2 debe estar más bien en relación al daño irreparable en el citoesqueleto, y por ende de la célula neuronal.

Tiempo mínimo para observar la neuropatología del daño cerebral hipóxico-isquémico

El modelo experimental de Levine es útil no sólo para estudiar la fisiopatología del daño cerebral hipóxico-isquémico, sino también como modelo para la experimentación de diferentes terapias en relación con esta patología. Para ello es importante conocer el tiempo mínimo que ha de esperarse para observar la neuropatología final.

Considerando que la lesión atrófica o la lesión cística se consolidan entre 1 y 2 semanas después del insulto

hipóxico-isquémico, sería prudente fijar en 2 semanas el tiempo mínimo para el estudio patológico.

Vulnerabilidad de la región CA3 del hipocampo

Conocida es la vulnerabilidad del hipocampo tanto a la isquemia como a la hipoxia-isquemia, sea en animales adultos⁽⁵⁾ como en fetos⁽¹⁹⁾ y neonatos⁽²⁰⁾. En roedores adultos se ha observado la vulnerabilidad selectiva en la región CA1⁽⁵⁾ pero no en la CA3. Esta diferencia podría explicarse por razones de maduración neuronal. Antes del establecimiento de las sinapsis, las neuronas son menos sensibles a la anoxia⁽²¹⁾. La neurogenesis de la región CA1 del hipocampo parece ser más tardía que la CA3⁽²²⁾, y ello podría conferirle alguna protección relativa.

¿Síntesis de HSP72 y protección neuronal?

Se ha especulado bastante en relación al posible efecto protector del HSP72. En modelos adultos de isquemia precondicionada se ha observado que la protección neuronal estuvo relacionada con una aceleración de la inducción del HSP72⁽²³⁾.

Si correlacionamos en nuestro estudio la secuencia de la síntesis del HSP72 con la neuropatología, encontramos que en regiones con síntesis temprana de esta proteína la incidencia del daño neuronal era menor (p.ej., giro dentado) y viceversa, la síntesis tardía del HSP72 se relacionaba con una alta incidencia de pérdida neuronal (p.ej., CA3 del hipocampo).

Sin embargo, sería aún muy arriesgado concederle un papel de protección a las proteínas del golpe de calor. Muchos factores intervienen en la vulnerabilidad o resistencia de las neuronas, empezando desde el flujo sanguíneo regional, la distribución de sinapsis excitatorias e inhibitorias, y los diferentes fenómenos que ocurren a nivel molecular, la naturaleza específica de cada tipo de neurona, etc.

Aún queda mucho por investigar en este importantísimo tema, que puede darnos alguna luz en el aún oscuro mundo de la Perinatología.

CONCLUSIONES

1) Entre el 15 y 20% de ratas sometidas a hipoxia-isquemia no se observó daño anatómico (hasta las 4 semanas).

- 2) La lesión atrófica o cística se consolidó entre 1 y 2 semanas después de la hipoxia-isquemia, a pesar de una aparente recuperación inmunohistoquímica a las 72 horas.
- 3) La neuropatología final del daño cerebral hipóxico-hisquémico debe ser observado por lo menos a las 2 semanas después del insulto.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Volpe J.** Neurology of the newborn. 3rd. Ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995, p.211-369.
- 2) **Johnston M.** Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 1983; 13: 511-8.
- 3) **Levine S.** Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36: 1-17.
- 4) **Rice JE 3d, Vannucci RC, Brierley JB.** The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9: 131-41.
- 5) **Kirino T, Tamura A, Sano K.** Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res* 1985; 63: 39-58.
- 6) **Mallard EC, Gunn AJ, Williams CE, Johnston BM, Gluckman PD.** Transient umbilical cord occlusion causes hippocampal damage in the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167(5): 1423-30.
- 7) **Brown IR.** Hyperthermia induces the synthesis of heat shock protein by polysomes isolated from the fetal and neonatal mammalian brain. *J Neurochem* 1983; 40(5): 1490-3.
- 8) **Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar SM, Mandabach M, Sharp FR.** Heat shock proteins as markers of neural injury. *Mol Brain Res* 1989; 6(1): 93-100.
- 9) **Ferriero DM, Soberano HQ, Simon RP, Sharp FR.** Hypoxia-ischemia induces heat shock protein-like (HSP72) immunoreactivity in neonatal rat brain. *Dev Brain Res* 1990; 53(1): 145-50.
- 10) **Tucker RP.** The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Rev* 1990; 15(2): 101-20.
- 11) **Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, y col.** Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage: immunohistochemical investigation of dentritic damage. *Neuroscience* 1989; 31(2): 401-11.
- 12) **Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K.** Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177(3): 519-26.
- 13) **Ota A.** Temporal profile of the hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Proceedings of the 44th. Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation. J Soc Gynecol Invest* 1997; 4: 150.
- 14) **Mortola JP, Dotta A.** Effects of hypoxia and ambient temperature on gaseous metabolism of newborn rats. *Am J Physiol* 1992; 263(2) Pt 2: R267-72.

- 15) **Vass K, Welch WJ, Nowak TS Jr** . Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988; 77(2): 128-35.
- 16) **Sherwood N**. A stereotaxic atlas of the developing rat brain. Berkeley (CA): University of California Press; 1970.
- 17) **Bilger A, Nehlig A**. Regional cerebral blood flow response to acute hypoxia changes with postnatal age in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 76(2): 197-205.
- 18) **Vannucci RC, Lyons DT, Vasta F**. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke* 1988; 19(2): 245-50.
- 19) **Mallard EC, Gunn AJ, Williams CE, Johnston BM, Gluckman PD**. Transient umbilical cord occlusion causes hippocampal damage in the fetal sheep. *AmJ Obstet Gynecol* 1992; 167(5): 1423-30.
- 20) **Towfighi J, Yager JY, Housman C, Vannucci RC**. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Act Neuropathol (Berl)* 1991; 81(5): 578-87.
- 21) **Rothman SM**. Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* 1983; 220(4596): 536-7.
- 22) **Bayer SA**. Development of the hippocampal region in the rat, I: Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 1980; 190(1): 87-114.
- 23) **Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K**. Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience* 1993; 56(4): 921-7.