

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**INFLUENCIA DE LAS MODIFICACIONES DE
LA GLUCEMIA Y DE LA HIPOTERMIA EN
EL VOLUMEN DE INFARTO CEREBRAL
EN LA RATA**

JOSE MARIA TREJO GABRIEL Y GALAN

1996

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El presente trabajo reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido como tesis doctoral

Vº Bº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Fdo.: _____
(Fecha y firma)

Fdo.: R. Alcalá Santaella
(Fecha y firma)

DNI

DNI

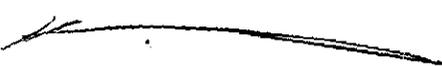
~~D. Rafael Enríquez de Salamanca Lorente, como Catedrático y Director del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid~~
~~INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO~~

INFORMO: Que una vez examinado el Trabajo presentado por **D. José M^a Trejo Gabriel y Galan**, titulado: "**Influencia de las modificaciones de la glucemia y de la hipotermia en el volumen de infarto cerebral en la rata**", dirigido por el Prof. D. Rafael Alcalá-Santaella, éste Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

El Director del Departamento

10 SET. 1996



Feo.: Prof. Dr. R. Enríquez de Salamanca

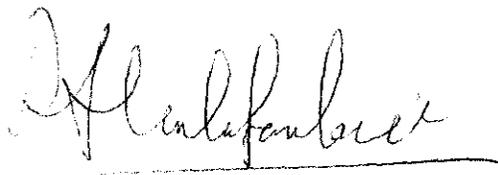
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

D. RAFAEL ALCALA SANTAELLA, CATEDRATICO EMERITO DE
PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

C E R T I F I C A : Que D. Jose María Trejo Gabriel y Galán ha realizado
el trabajo titulado "INFLUENCIA DE LAS
MODIFICACIONES DE LA GLUCEMIA Y DE LA
HIPOTERMIA EN EL VOLUMEN DE INFARTO
CEREBRAL EN LA RATA" bajo mi dirección.

Puedo testimoniar que dicho trabajo ofrece las
características de originalidad y rigor científico que
son exigibles para optar al grado de Doctor en
Medicina.

De todo ello expido el presente Certificado, para que
conste donde convenga, según la Legislación vigente.



Fdo.: Prof. Dr. Alcalá Santaella.

ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO EN PARTE POR EL FONDO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS DE LA SEGURIDAD SOCIAL (EXPEDIENTE 92/0933), POR LA BECA DE LA COMPAÑÍA FARMACEUTICA BAYER DEL AÑO 1992 OTORGADA POR LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROLOGIA, Y POR UNA BECA DE LA CAJA DE AHORROS MUNICIPAL DE BURGOS.

A CARMEN, CARLOS, BLANCA Y FERNANDO.

AGRADECIMIENTOS:

Al **Prof. Dr. Alcalá Santaella**, por haber apoyado desde el inicio y durante su larga realización éste trabajo científico y por sus orientaciones y aportaciones al mismo.

A la **Unidad de Investigación del Hospital "General Yagüe"**, y en particular a sus componentes, la **Dra. Coma del Corral**, por dotar a dicha Unidad del material necesario, a **Gabriela Martín** por sus excelentes preparaciones histológicas y a **Pilar Vega** por su apoyo solventando dudas en el procesamiento del texto.

Al los Dres. **Honorio Hernández** y **José Cordero**, por asesorarme en cuestiones estadísticas.

Al **Hospital "General Yagüe"** en general y en particular al **personal de Laboratorio** que realizó las determinaciones analíticas, y a los muchos que me han ayudado y animado durante éstos años.

Muy especialmente a **mi familia**, a la que por la realización de este trabajo no he dedicado el tiempo que se merece.

ABREVIATURAS:

- ACM: Arteria cerebral media.
- ACV: Accidente cerebrovascular.
- ATRO100: Atropina utilizada en anestésico por 100 grs. de peso de rata.
- DIAC100: Diacepám utilizado en anestésico por 100 grs. de peso de rata.
- EVC: Enfermedad vascular cerebral.
- FVC: Flujo vascular cerebral.
- GLUCEMB: Glucemia basal.
- GLUCEMM: Glucemia, media aritmética.
- GLUCEMP: Glucemia, media ponderada en el tiempo.
- HbF: Hemoglobina final.
- IHb: Incremento o disminución de hemoglobina.
- INSU100: Unidades de insulina utilizada por 100 grs. de peso de rata.
- KETA100: Ketamina utilizada en anestésico por 100 grs. de peso de rata.
- LCR: Líquido cefalorraquídeo.
- pCO₂: Presión arterial parcial de anhídrido carbónico.
- pO₂: Presión arterial parcial de oxígeno.
- TEMPBC: Temperatura basal cerebral.
- TEMPBR: Temperatura basal rectal.
- TEMPMC: Media aritmética de las temperaturas cerebrales.
- TEMPPC: Temperatura cerebral ponderada en el tiempo.
- TEMPMR: Temperatura media rectal.
- TEMPPR: Temperatura rectal ponderada en el tiempo.
- VOLART: Volumen de artefacto total.
- VOLIPOS: Porcentaje del infarto cortical posterior al surco de Rolando.
- VOLIPRES: Porcentaje del infarto cortical anterior al surco de Rolando.
- VOLPICOR: Volumen de infarto cortical proporcional al volumen cerebral.
- VOLPROI: Volumen de infarto cerebral proporcional al volumen cerebral total (**variable dependiente principal**).
- VOLPROI-A: Volumen proporcional de infarto excluyendo el artefacto.
- VOLPROI-V: Volumen proporcional de infarto excluyendo el volumen ventricular.
- VOLPROI-VA: Volumen proporcional de infarto excluyendo los volúmenes de artefacto y ventricular.
- VOLPIGB: Volumen de infarto de ganglios basales proporcional a su volumen total.

- VOLTCP:** Volumen total calculado por planimetría.
- VOLTICOR:** Volumen total de infarto cortical.
- VOLTOI:** Volumen total de infarto.
- VOLTIGB:** Volumen total de infarto de ganglios basales.
- VOLVENT:** Volumen ventricular.

INDICE.

INDICE

A. Introducción

A.1 Preámbulo.	12
A.2 Epidemiología	13
A.3 Fisiopatología del infarto cerebral.	
A.3.1 Mecanismos de muerte neuronal por isquemia	14
A.3.2 Circulación cerebral.	21
A.3.2.1 Fases de la isquemia cerebral.	24
A.3.2.2 Modelos de isquemia cerebral experimental.	26
A.3.2.3 Isquemia cerebral global experimental.	27
A.3.2.4 Isquemia cerebral regional experimental.	30
A.3.3 Circulación y metabolismo durante la isquemia cerebral	37
A.4 Glucemia e isquemia cerebral	
A.4.1 Metabolismo cerebral normal de la glucosa	39
A.4.2 Metabolismo de la glucosa durante la hipoglucemia.	42
A.4.3 Hiperglucemia e infarto cerebral.	45
A.4.4 Hiperglucemia y acidosis láctica.	49
A.4.5 Otros efectos de la hiperglucemia	53
A.4.6 Hiperglucemia de estrés en el infarto cerebral	54
A.4.7 Hipoglucemia en el infarto cerebral.	56
A.4.8 Daño neuronal por hipoglucemia.	57
A.5 Temperatura y metabolismo cerebral.	
A.5.1 Hipotermia en el cerebro sano.	61
A.5.2 Hipertermia en el cerebro sano	64
A.5.3 Hipotermia en el infarto cerebral.	65
A.5.4 Mecanismos de acción de la hipotermia en isquemia cerebral	67
A.5.5 Hipertermia en el infarto cerebral.	70

B. Objetivos.

B.1 Objetivos en el experimento sobre glucemia e infarto cerebral	74
B.2 Objetivos en el experimento sobre temperatura e infarto cerebral.	75

C. Material y metodos.

C.1 Animal experimental y condiciones experimentales generales durante el experimento.	77
C.2 Grupos experimentales.	79
C.3 Metodos para conseguir la hipoglucemia, la hiperglucemia, la hipotermia y la hipertermia	80
C.4 Cirugía.	82
C.5 Sacrificio y extracción cerebral.	85
C.6 Metodos histológicos.	85
C.7 Medición de áreas y volúmenes cerebrales.	90
C.8 Definición de las variables.	
C.8.1 Variables en el experimento sobre glucemia e infarto cerebral.	91
C.8.2 Variables en el experimento sobre temperatura e infarto cerebral	94
C.9 Metodos estadísticos.	
C.9.1 Metodos estadísticos en el experimento sobre glucemia e infarto cerebral	94
C.9.1 Metodos estadísticos en el experimento sobre temperatura e infarto cerebral.	96

D. Resultados.

D.1 Resultados en el experimento sobre glucemia e infarto cerebral	99
D.2 Resultados en el experimento sobre temperatura e infarto cerebral.	120

E. Discusión.

E.1 Discusión del experimento sobre glucemia e infarto cerebral	131
E.2 Discusión del experimento sobre temperatura e infarto cerebral.	148

F. Conclusiones.	163
-----------------------------------	-----

G. Bibliografía.	166
-----------------------------------	-----

A. INTRODUCCION

A. INTRODUCCION.

A.1 PREAMBULO.

Se suele considerar que la enfermedad vascular cerebral es la tercera causa de muerte en los países desarrollados, en su mayoría por infartos cerebrales isquémicos. Se ha avanzado en su prevención, pero una vez que se instaura, seguimos sin un solo tratamiento de utilidad demostrada.

Más que determinado tratamiento farmacológico, decidimos estudiar la influencia de dos variables biológicas a las que está sometido todo enfermo con accidente cerebrovascular (ACV): la glucemia y la temperatura. Estos dos parámetros están con frecuencia alterados en éstos enfermos, y existen datos para pensar que su alteración espontánea o provocada puede tener efectos significativos sobre el cerebro isquémico, en sentido positivo o negativo.

Muchos tratamientos que en principio tuvieron resultados favorables a nivel de experimentación animal, no tuvieron éxito al ser aplicados en seres humanos, como ha sucedido con los barbitúricos, la hemodilución o algunos antagonistas del calcio. Tal vez un mayor número de trabajos experimentales hubiera evitado su decepcionante utilización en el hombre. Por éste motivo y por la falta de acuerdo en la literatura médica respecto al papel de la glucemia y la temperatura en el infarto cerebral, creemos que son necesarios nuevos trabajos bien controlados. Dichos trabajos necesariamente han de ser de en modelos animales experimentales, pues la complejidad del cerebro y su circulación, hace que el efecto de cualquier tratamiento que utilicemos pueda ser confundido por muchas variables biológicas que solo pueden mantenerse constantes en el laboratorio. Además únicamente tratamientos que han demostrado su utilidad y seguridad en experimentación animal pueden ensayarse en seres humanos. Por ello nos decidimos a estudiar el efecto de las

modificaciones de la glucemia y de la hipotermia en el infarto cerebral en la rata. Hemos realizado dos trabajos independientes: uno variando la concentración de glucosa sanguínea, y el otro con hipotermia. Los encabezamos con un título único, al compartir los dos trabajos la misma metodología y modelo experimental.

A.2 EPIDEMIOLOGIA.

Como se acaba de referir, en los países desarrollados, la enfermedad vascular cerebral (EVC), es la tercera causa de muerte después de la cardiopatía y el cáncer, y la primera de incapacidad, pues muchos de los pacientes que sobreviven no pueden llevar una vida independiente, lo que tiene graves consecuencias humanas y económicas para el enfermo, su familia y la sociedad en general. En nuestro país aún podría ser más frecuente que la cardiopatía isquémica como causa de muerte (OLIVERAS, 1987).

Su tasa de mortalidad en Europa y Norteamérica ronda los 100 pacientes por cada 100.000 habitantes/año (FRATIGLIONI, 1983). Esta tasa ha disminuido en los últimos años, lo que se ha atribuido a un mejor control de la hipertensión arterial (AUSTRALIAN THERAPEUTIC TRIAL, 1980). La tasa de mortalidad en los varones es sólo ligeramente superior a la de las mujeres, en contraste con la cardiopatía isquémica, donde predomina francamente la mortalidad en varones. También existen diferencias raciales, con una mayor mortalidad entre los estadounidenses de raza negra frente a los de raza blanca.

Su incidencia se ha calculado entre 100 y 250 casos nuevos por 100.000 habitantes y año para estos mismos países (KURTZKE, 1985), con una distribución de 82 % de infartos isquémicos tromboembólicos, 10 % hemorragias intracraneales y un 6 % de hemorragias subaracnoideas (MOHR, 1978). La prevalencia se ha calculado entre 500-700/100.000 habitantes.

Entre los factores de riesgo, la edad y el sexo son importantes pero

inmodificables. Los factores de riesgo para enfermedad vascular en general presentan en la patología cerebrovascular algunas particularidades: el más importante es la hipertensión arterial, y la disminución de la mortalidad e incidencia de EVC observada en los países desarrollados parece deberse a su mejor control. Las cardiopatías embolígenas (especialmente la fibrilación auricular) y la diabetes mellitus son otros factores de riesgo establecidos. Hiperlipidemia, tabaquismo, consumo de alcohol, anticonceptivos orales y obesidad, no están tan claramente asociados a EVC como a otras patologías arteriales.

Aparte del control de los factores de riesgo vascular, no existen tratamientos farmacológicos preventivos primarios para la población sana, aunque en enfermos que han sufrido un ACV transitorio o establecido, es posible la prevención secundaria con ácido acetilsalicílico o ticlopidina y mediante endarterectomía carotídea cuando la arteria carótida interna está estenosada en un 70 % o más.

A.3 FISIOPATOLOGIA DEL INFARTO CEREBRAL.

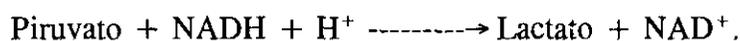
A.3.1 MECANISMOS DE MUERTE NEURONAL POR ISQUEMIA.

En la hipoxia cerebral disminuye el aporte de oxígeno. Durante la isquemia cerebral, no solo deja de llegar oxígeno, sino también sustratos energéticos (fundamentalmente glucosa), por lo que se agotan los depósitos de glucosa y ATP.

La isquemia actúa a varios niveles hasta desembocar en la muerte neuronal:
A.- Nivel intracelular; B.- Membrana celular; C.- Sinápsis. D.- A consecuencia de la reperfusión. E.- Mecanismos recientemente implicados.

A.- Nivel intracelular: En el interior de la neurona isquémica, se agotan

rápidamente las reservas de fosfatos de alta energía: a los 30 segundos de la isquemia el ATP cae al 50% de los valores control y la fosfocreatina al 15% . Al faltar oxígeno se interrumpe el metabolismo oxidativo de la glucosa (el de mayor eficiencia energética) y se multiplica por siete la vía de la glucólisis anaerobia, aumentando sus metabolitos, especialmente el ácido láctico, con la consiguiente acidosis tisular. El ácido pirúvico en cambio no aumenta sino que disminuye, pues al acumularse H^+ y NADH por la interrupción del metabolismo oxidativo, la siguiente reacción se desplaza a la derecha:



La acidosis láctica que se produce es proporcional a los valores preisquémicos de glucosa más glucógeno, por lo que puede ser influida por la hipoglucemia o hiperglucemia, y como veremos también por la temperatura, las dos variables que estudiamos en éste trabajo.

Dicha acidosis puede dañar las células liberando o activando enzimas lisosomales y produciendo vasoconstricción local.

Es peor conocido el significado de los incrementos (como el de succinato) o disminuciones (como los de α -cetoglutarato o ácido oxalacético) de metabolitos del ácido cítrico provocados por la isquemia. El nivel de aminoácidos no suele alterarse, excepto un aumento de GABA, alanina y amonio.

B.- A nivel de membrana celular: el agotamiento energético que provoca la isquemia, hace fracasar las bombas iónicas que precisan del ATP. El sodio entra, causando edema en las células cerebrales; también sale potasio y entra calcio, desencadenándose varias reacciones que llevan a la muerte celular. La secuencia de acontecimientos, (MOCHIZUKI,1991) iniciados por el fracaso energético oxidativo y la acidosis provocada por glucólisis anaerobia, podría ser la siguiente:

- 1- Aumento de la concentración de hidrógeno intracelular.
- 2- Algunos de los iones H^+ salen de la célula y entran iones sodio que no

pueden ser expulsados por la bomba iónica del sodio a causa del fracaso energético.

3- Las concentraciones intracelulares de sodio aumentan produciendo despolarización de la membrana celular, por lo que los canales del calcio dependientes de la diferencia de potencial se abren (apertura dependiente del voltaje) y entra calcio en la célula.

4- La bomba iónica del calcio no puede expulsarlo debido al fracaso energético, por lo que se acumula en la célula. Existe consenso en que el aumento del calcio intracelular es la vía final que lleva a la necrosis de todas las células (neuronas, glía, células endoteliales) del área de infarto, pero se discute porqué aumenta el calcio y cómo actúa.

Para algunos autores, el calcio activa muchas enzimas autodigestivas intracelulares entre las que se encuentran las fosfolipasas, que destruyen las membranas de las mitocondrias paralizando la generación de energía y perforan la membrana plasmática impidiendo el mantenimiento del medio interno celular, motivos ambos de muerte celular.

En el proceso de degradación de las membranas, se liberan de las mismas fosfolípidos y ácidos grasos libres (uno de los más estudiados es el ácido araquidónico). Estos, de por sí también aumentan los niveles de calcio, al movilizar los depósitos intracelulares e inhibir la fosforilización oxidativa que genera energía para la bomba iónica expulsora de calcio. Sobre la importancia de los fosfolípidos en el daño celular isquémico no hay acuerdo general, pues algunos autores no los han encontrado aumentados en isquemia experimental (RHENCRONA, 1982).

C.- A nivel de sinápsis. Las neuronas que sufren la isquemia liberan sus neurotransmisores en la sinápsis de forma incontrolada. Neurotransmisores excitadores como el aspartato y el glutamato, cuando son vertidos masivamente al espacio sináptico, resultan neurotóxicos: el glutamato abre un canal para el calcio, que así entra en la célula. El calcio activa las proteasas neutras que descomponen la membrana celular lipídica.

Según el agonista farmacológico al que se unen, se han caracterizado dos

tipos de receptores para el glutamato: el que es activado por el NMDA (N-metil-D-aspartato), y el que se activa por el AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico). El receptor NMDA abre un canal iónico al calcio, y el AMPA abre un canal al sodio. El sodio intracelular aumentado impide el funcionamiento del transportador que intercambia el sodio extracelular por calcio intracelular. Por lo tanto, la activación de cualquiera de los dos receptores aumenta el calcio en la neurona y la mata. Se ha intentado proteger a las neuronas de la isquemia global cerebral con antagonistas de ambos receptores, pero solo los antagonistas del receptor AMPA ha tenido este efecto.

En el hipocampo y las capas III, V y VI de la corteza cerebral están las neuronas que se lesionan con los períodos más cortos de isquemia y que se han llamado "neuronas selectivamente vulnerables". El mecanismo de los neurotransmisores excitadores es el que mejor explica porqué existen neuronas selectivamente vulnerables a la isquemia (serían las que reciben aferencias del neurotransmisor), y lo que ha llamado KIRINO la "muerte neuronal diferida" (KIRINO, 1982). Este tipo de lesión neuronal se ha observado en modelos experimentales y consiste en que tras un período de isquemia transitoria no se produce al principio daño celular, pero pasado un tiempo, las únicas células cerebrales que se lisan son las neuronas y no se produce edema. Ello sucede a pesar de un flujo sanguíneo y un estado energético normales, y parece afectar selectivamente a las neuronas que reciben aferencias glutamatérgicas por las que reciben una sobreestimulación postisquémica excitatoria hasta que se necrosan.

Otra hipótesis para explicar la muerte neuronal diferida propone que si el daño no es tan extenso como para producir la muerte inmediata pero la célula tiene que utilizar todas sus metabolitos energéticos en mantener las bombas electrolíticas, no existen reservas para la biosíntesis de otras moléculas necesarias para el recambio y mantenimiento de la estructura y funciones celulares, por lo que finalmente se produce también la muerte celular, aunque diferida.

D.- A consecuencia de la reperusión. Cuando se lisa el trombo arterial o llega sangre al área isquémica por circulación colateral, decimos que se ha producido

reperfusión, y contra lo que cabría esperar, la reperfusión puede empeorar el daño tisular. Esto se ha atribuido a los radicales libres que llegarían con la sangre.

Los radicales libres son átomos o moléculas que se forman por la ruptura de un enlace covalente, en cuya capa más externa tienen un electrón no apareado y por lo tanto son sustancias de gran reactividad que pueden atacar a otros compuestos, peroxidándolos. En concreto pueden peroxidar los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que hay en las membranas de las mitocondrias y del retículo endoplásmico. De esta manera se produce ácido araquidónico que tiene propiedades proagregantes y vasoconstrictoras, por lo que puede aumentar la isquemia.

Estudios experimentales tamponando los radicales libres han evitado el aumento de la lesión que produce la reperfusión.

El mecanismo de los radicales libres puede explicar también el daño preferente de las denominadas "neuronas selectivamente vulnerables". Su bajo contenido en glutatión peroxidasa (tampón natural de radicales libres) o su alto contenido en hierro facilitarían la lesión. El hierro actúa como catalizador de la peroxidación de los lípidos de la membrana por los radicales libres.

Aunque se producen radicales libres en muchas reacciones celulares en el citoplasma y la cadena respiratoria mitocondrial, normalmente no se producen daños, pues en la cadena respiratoria los pares de electrones acaban en el oxígeno para formar agua y en los tejidos hay captadores naturales de radicales libres como las catalasas, peroxidasas, superóxidodismutasa, la vitamina E, el glutatión, y el ácido ascórbico. Este último está disminuido en la isquemia cerebral, al ser consumido por las reacciones que generan radicales libres (FLAMM, 1978). La reperfusión aportaría una sobrecarga de radicales libres que no puede ser contrarrestada por el tejido dañado.

Otra consecuencia negativa de la reperfusión con permeabilidad endotelial aumentada y con membranas celulares dañadas, es el edema, responsable de la mayoría de las muertes precoces en accidentes cerebrovasculares isquémicos.

Con la reperfusión se recuperan inicialmente los valores de ATP y ácido láctico, para descender posteriormente a las 6-24 horas de la recirculación a los valores iniciales tras la isquemia, período en que comienza a manifestarse el daño histológico (PULSINELLI, 1983a).

E.- Mecanismos recientemente implicados en la muerte neuronal por isquemia.

En los tres últimos años se ha comenzado a estudiar el papel de los factores de crecimiento, de las proteínas de estrés celular y del óxido nítrico en la isquemia cerebral.

Entre las células cerebrales, las neuronas son las primeras en morir, pues debido a su especialización no pueden multiplicarse y ha disminuído su capacidad reparadora de la membrana.

Pero el cerebro tiene receptores para factores de crecimiento como la insulina, el factor de crecimiento de los fibroblastos, el factor de crecimiento nervioso y otros, y estos factores aumentan durante la isquemia, probablemente por su función reparadora.

Cuando aumentan los factores de crecimiento, se transcriben los protooncogenes como el c-fos y c-jun, y las proteínas que éstos codifican (el complejo AP-1) se unen al DNA celular. De esta manera influyen los factores de crecimiento sobre la proliferación y diferenciación o reparación celular (WHITE, 1993).

La inducción de proteínas de estrés celular como la "proteína del golpe de calor" HSP-72 también puede tener un papel en el daño o la protección celular durante la isquemia, aspecto sobre el que existe controversia.

Esta proteína aparece en el cerebro durante la reperfusión en las neuronas y en menor medida en las células gliales y endoteliales. La síntesis de esta proteína es

proporcional a la duración de la isquemia, y su expresión es máxima no en el foco necrótico sino a su alrededor, por lo que la mayoría de los autores piensan que se manifiesta en células destinadas a sobrevivir y que por lo tanto tiene un papel protector frente a la isquemia cerebral. Provocar isquemia subletal de corta duración en cultivos neuronales hace que posteriores eventos isquémicos se toleren mejor, y a su vez induce la proteína HSP-72 lo que podría deberse a una función protectora de la misma (KIRINO, 1991).

Otros autores por el contrario opinan que dicha proteína no tiene papel protector sino que es un marcador de lesión celular. El que no aparezca en células destinadas a morir por la isquemia indicaría una inhibición de la síntesis de proteínas en dichas células, pues en cambio el RNAm de la HSP-72 sí puede detectarse en las mismas (NOWAK, 1991).

Como veremos más adelante en el apartado A.5.2, los cambios de temperatura modifican la expresión de la HSP-72.

El óxido nítrico (NO) es producido por varios tejidos, y el sintetizado por las neuronas se ha implicado últimamente en el daño neuronal causado por la isquemia. Aunque este compuesto solo es producido por el 1-2% de las neuronas, éstas tienen proyecciones muy difusas, y es una molécula que difunde mucho al ser un gas. En sentido opuesto, el NO producido por los vasos tiene efecto vasodilatador, por lo que podría tener un potencial terapéutico.

Estamos pasando de medir el metabolismo cerebral solo en cerebros de animales experimentales muertos a poderlo estudiar "in vivo" en las personas gracias a una nueva herramienta: la espectroscopia por resonancia magnética. Esta nueva tecnología ha confirmado en general en sujetos con ictus los hallazgos de la isquemia experimental en animales (WELCH, 1992). Por ejemplo, en pacientes con ictus agudo, la acidosis cerebral se asocia a bajo flujo sanguíneo cerebral y depleción de ATP, lo que sugiere isquemia persistente, y la alcalosis se asocia con recuperación del ATP y flujo cerebral más alto, lo que sugiere reperfusión.

Así, en las primeras 24 horas se detecta una disminución de los picos

correspondientes al ATP y la fosfocreatina, y simultáneamente una acidosis. Posteriormente se recuperan los fosfatos de alta energía pero continúa el daño clínico (por lo que se piensa que éste no depende solo de un fallo energético sino de otras alteraciones del metabolismo). Durante la acidosis también se encuentra un aumento del magnesio y del lactato, y una reducción de los picos correspondientes a los fosfolípidos. Por ello tiene cada vez más interés el estudio del metabolismo del cerebro isquémico, con el fin de encontrar cambios que puedan reducir el área de infarto cerebral en las personas.

A.3.2 CIRCULACION CEREBRAL.

En condiciones normales, el flujo vascular cerebral (FVC), es de 55 ml/100 gr. de tejido/minuto; el consumo de oxígeno es de 3.5 ml /100 gr. de tejido/minuto y el consumo de glucosa de 5 mgr/100 gr. de tejido/minuto. El FVC y el consumo de oxígeno parecen estar aumentados en la primera década, y son cuatro veces superiores en la sustancia gris con respecto a la sustancia blanca. El cerebro consume aproximadamente un tercio del oxígeno y un décimo de la glucosa que recibe (POWERS, 1992). Extrae energía de la glucosa fundamentalmente por metabolismo oxidativo y de dicha energía consume un 30 % en la transmisión sináptica, otro 30 % en el transporte iónico y el restante 40 % en otros requerimientos, muchos de ellos todavía desconocidos.

El FVC viene determinado por el cociente entre la presión de perfusión cerebral y las resistencias cerebrovasculares (RCV). En condiciones normales, la presión de perfusión cerebral es equivalente a la tensión arterial. Cuando hay hipertensión intracraneal, hay que restarla de la tensión arterial para tener la presión de perfusión cerebral. Por lo tanto, el principal determinante del FVC es la RCV, que se determina por la siguiente fórmula:

$$RCV = L \times n / 6\pi \times r^4$$

siendo L la longitud del vaso, r su diámetro y n la viscosidad. De estos factores el diámetro vascular y la viscosidad sanguínea son los únicos modificables.

Las arterias cerebrales de pequeño calibre y las arteriolas se contraen cuando sube la presión sistémica y se dilatan cuando ésta baja. Gracias a ello, el cerebro mantiene constante su flujo sanguíneo a pesar de los cambios en la tensión arterial, lo que se conoce como autoregulación.

La autoregulación cerebral es una respuesta fisiológica rápida que se desarrolla en su totalidad en 15 a 30 segundos tras cada cambio de presión sistémica, y de esta manera protege al cerebro de las variaciones fisiológicas y patológicas que se producen en la tensión arterial. Se mantiene así el flujo homogéneo necesario, dado que la falta de oxígeno y nutrientes produce su fracaso funcional y posteriormente su daño estructural mucho antes que en los demás órganos.

En individuos no hipertensos, la presión arterial media puede variar entre 65 y 150 mm. de Hg. sin llegar a traspasar los límites de la autoregulación. La presión arterial media se calcula sumando a la presión diastólica un tercio de la diferencia entre la presión sistólica y la diastólica. Los hipertensos tienen los límites de presión entre los que se mantiene la autoregulación desplazados hacia presiones más altas, por lo que toleran mejor los incrementos de presión, y peor los descensos.

Cuando la presión arterial media sistémica baja por debajo de los límites de la autoregulación (50-60 mm Hg. en seres humanos y 70-80 mm Hg. en ratas), el cerebro queda a merced de la presión de perfusión sistémica, que si baja lo suficiente puede llegar a provocar isquemia cerebral. Si por el contrario la tensión arterial sube por encima de los límites de la autoregulación, la elevada presión arterial que se transmite al cerebro puede producir encefalopatía hipertensiva y aumento de la presión intracraneal.

Esta función de autoregulación del flujo sanguíneo cerebral se pierde en la zona de isquemia, al ser dañados los vasos, por lo que el flujo depende más de lo habitual de la presión sistémica. En concreto, cuando el flujo sanguíneo cae por debajo del 30 % del basal, se pierde por completo la autoregulación (PULSINELLI, 1992).

La tensión de anhídrido carbónico ($p\text{CO}_2$) y el pH periarteriolar son el

principal factor metabólico que regula el flujo sanguíneo cerebral. Así, la hipercapnia produce vasodilatación y la hipocapnia vasoconstricción. Esta reactividad de los vasos disminuye poco en la isquemia leve o moderada, pero desaparece por completo cuando es severa. Respecto al oxígeno, su disminución provoca un inmediato aumento compensatorio del flujo cerebral, pero al no reaccionar tampoco a la hipoxia los vasos isquémicos, una disminución de la pO_2 puede acentuar la isquemia cerebral. El pH del tejido cerebral no se influye por la alcalosis o acidosis sanguíneas, pues la barrera hematoencefálica es impermeable al bicarbonato y los iones hidrógeno. Sí depende en cambio de la concentración de bicarbonato del tejido cerebral (lo que está en función de su metabolismo) y del anhídrido carbónico que llega por la sangre.

El flujo sanguíneo cerebral aumenta con el metabolismo tisular: aumenta al doble durante las convulsiones epilépticas, en las que el metabolismo también se duplica, y aumenta en un 30 % en las regiones que están desarrollando una actividad fisiológica (el área motora con los movimientos...). El coma barbitúrico disminuye por el contrario la actividad y el metabolismo neuronal y consiguientemente el flujo.

El sistema nervioso simpático contrae las arterias cerebrales de mayor resistencia y tamaño, pero no las de menor resistencia (arteriolas precapilares) a cuyo nivel se produce la autoregulación. Por ello, cuando el sistema nervioso simpático aumenta las resistencias, una vasodilatación de las arteriolas precapilares, más distales y de menor tamaño, mantiene el flujo constante. Sin embargo, el límite superior e inferior de la autoregulación, se desplazan hacia arriba.

El sistema renina-angiotensina, en la pared de los vasos, contribuye a la autoregulación cerebral. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina desplazan los límites de la autoregulación hacia abajo. Probablemente se debe a que disminuyen el tono vascular en los vasos cerebrales de mayor resistencia mediado por la angiotensina II.

La resistencia al paso de un fluido también depende de su viscosidad, y se ha intentado disminuir la viscosidad de la sangre para mejorar la circulación cerebral (MOCHIZUKI, 1991). A nivel de la aorta y hasta las arterias medianas, la

viscosidad depende principalmente del hematocrito. A nivel de las arteriolas y pequeñas arterias, los eritrocitos se alinean en el eje central y es el deslizamiento del plasma lo más importante. Dentro del plasma, las grandes moléculas como el fibrinógeno y las globulinas aumentan su viscosidad, pero no la albúmina que además disminuye la agregación de eritrocitos producida por el fibrinógeno. En los capilares, de diámetro menor que los eritrocitos, lo más importante es la deformabilidad de los mismos.

Para aumentar el flujo, se ha intentado actuar a varios niveles: disminuir el hematocrito por venopunción o disminuir la viscosidad del plasma con expansores coloidales (hipervolemia dilucional) que además disminuyen la agregación de eritrocitos y mejoran su deformabilidad. Sin embargo los estudios clínicos no han podido demostrar claramente la utilidad de estas medidas.

El flujo y el metabolismo cerebral pueden reducirse a distancia del lugar donde primitivamente se produce la isquemia, lo que se ha llamado diasquisis. El metabolismo se reduce en la misma medida que el flujo, lo que indica que la causa no es una reducción del aporte sino de la demanda, por menor metabolismo de las zonas que son menos activadas por las fibras aferentes de las áreas isquémicas (POWERS, 1992).

A.3.2.1 FASES DE LA ISQUEMIA CEREBRAL.

Como se ha dicho, el cerebro humano en reposo recibe 55 ml/100 grs de tejido/min. y el de la rata el doble. Según se va reduciendo el flujo se producen gradualmente distintos acontecimientos en el cerebro: cuando desciende a 30-35 ml aumenta el hidrógeno extracelular; cuando se reduce por debajo de 20 ml se produce silencio eléctrico y cuando baja de 10-15 ml, el daño cerebral es irreversible.

Todos estos hechos se producen al mismo tiempo en un solo infarto cerebral, pues la isquemia no tiene el mismo grado de intensidad en toda el área irrigada por

una arteria, y según el grado, tiene diferentes consecuencias. La zona central en la que la isquemia es más intensa, tiene un flujo inferior a 10 ml./100 grs. de tejido/minuto. En ella aumenta el potasio extracelular, pues se daña de forma irreversible la membrana plasmática y se produce la necrosis del tejido (incluso si la isquemia se mantiene durante períodos tan cortos como 12 minutos).

Este umbral de 10 ml/100 grs de tejido /minuto, parece ser constante para las diferentes especies, y se ha calculado experimentalmente tanto en babuinos con oclusión de la arteria cerebral media (BRANSTON, 1977; ASTRUP, 1977), como en ratas (ASTRUP, 1979). Cuando el flujo desciende a 16 ml/100 grs de tejido /minuto se produce un fallo funcional con aplanamiento del electroencefalograma y de los potenciales evocados corticales y cesa la actividad de las neuronas aisladas (HEISS, 1976). Este umbral para el fallo electrofisiológico ha sido calculado tanto en animales de experimentación (SYMON, 1977), como en endarterectomías en seres humanos en las que se ha clampado la arteria y se ha medido el flujo y simultáneamente el EEG, averiguando que un flujo por debajo de 19 ml/100 grs/min, aplana el EEG (TROJABORG, 1973).

Si el flujo no desciende por debajo de los 10 ml/100 grs/min, la función puede recuperarse al aumentar el aporte sanguíneo y no se producen alteraciones histológicas. A esta zona en que la recuperación es todavía posible pues no existen lesiones irreversibles, es donde se dirigen los intentos terapéuticos y se ha denominado zona de "penumbra isquémica" (ASTRUP, 1981). En la perifería de la isquemia el flujo es mayor de 20 ml./100 grs. tejido/min. e incluso suele haber hiperemia, y no se producen alteraciones funcionales ni histológicas. Valores similares de flujo sanguíneo cerebral se han medido por tomografía por emisión de positrones en seres humanos.

Respecto al consumo de oxígeno, el valor límite por debajo del cual se produce infarto cerebral es de 1,3 ml/100 grs. de tejido/minuto (POWERS, 1985).

Como vimos, solo cuando la presión de perfusión baja por debajo del límite inferior de la autorregulación (50 mm de Hg.), desciende el flujo sanguíneo cerebral. El fallo del metabolismo energético no se produce hasta que la presión de perfusión

se reduce por debajo de 40 mm. de Hg. (lo que produce una reducción del flujo sanguíneo cerebral por debajo del 50% de lo normal). Entre ambas cifras de presión de perfusión puede disminuir el flujo sanguíneo cerebral sin afectarse el metabolismo energético.

En la zona de "penumbra isquémica", se intercalan períodos de silencio electrofisiológico con períodos de conductancia iónica anormal manifestados como despolarización-repolarización (despolarización anóxica recurrente) (NERDEGAARD, 1986). Esta despolarización se produce por apertura de los canales iónicos que son dependientes de energía, con salida de potasio y entrada de sodio y calcio, y liberación de neurotransmisores excitatorios incluyendo el aspartato y glutamato.

Se puede producir daño neuronal selectivo, o infarto con necrosis de todos los elementos celulares dependiendo no solo del flujo (grado de isquemia), sino de la duración y topografía. Así, la duración de la isquemia focal necesaria para producir un infarto isquémico irreversible es de cuatro a ocho horas en el mono (CROWELL, 1981). En seres humanos es más difícil de saber con seguridad aunque es probablemente similar por lo que los tratamientos con trombolíticos en clínica humana se realizan solo en las seis primeras horas.

En seres humanos, la isquemia cerebral global produce pérdida de conciencia a los 6-7 segundos, momento en que aparecen en el EEG ondas lentas, y si se mantiene la isquemia el EEG se aplana. Interrupciones de la circulación de hasta 100 sgs. se han seguido de recuperación completa.

A.3.2.2 MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL.

La gran mayoría de los modelos experimentales se ha descrito en roedores, por su bajo precio, motivos éticos, mejor conocimiento de la patofisiología del

modelo, y por su similitud anatómica, metabólica y de flujo con el hombre (PULSINELLI, 1992). Por ello cuando hablamos de modelos de isquemia nos referiremos en general a roedores, especialmente a ratas, aunque la mayoría son también aplicables a animales de mayor tamaño.

Los modelos experimentales de isquemia cerebral, según la topografía se han clasificado en globales y regionales o focales, y según la cronología en reversibles e irreversibles. La utilización de unos u otros depende de la hipótesis que se quiera poner a prueba y de qué situación clínica humana queramos remedar: la parada cardíaca (modelos de isquemia global) o el accidente cerebrovascular (modelos de isquemia focal).

Como se ha mencionado, para que se produzca un fallo cerebral electrofisiológico (con aplanamiento electroencefalográfico e interrupción de la función aunque no necrosis) es necesario reducir el flujo por debajo de un nivel crítico que en varias especies, incluida la humana, es de 15-18 ml./100 grs. de tejido cerebral/minuto aproximadamente, y para que se produzca infarto cerebral, el flujo debe reducirse por debajo de 10 ml/100 grs tejido/min.

A.3.2.3 ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EXPERIMENTAL

El equivalente en seres humanos es la parada cardíaca, que debe durar menos de 5-10 minutos para que no se siga de un daño neurológico irreversible.

En los modelos animales de isquemia global se interrumpe el flujo cerebral temporalmente: de 5-15 minutos aunque en algunos casos se mantiene la isquemia 30-60 minutos antes de restablecer la circulación cerebral.

La isquemia puede ser completa (la que más se asemeja a la parada cardíaca humana), lo que se ha conseguido parando el corazón del animal transitoriamente, con posterior reanimación. Otros métodos de isquemia cerebral global completa han

sido la oclusión de la aorta ascendente, el torniquete cervical al que se añade hipotensión u oclusión de las arterias vertebrales y el aumento de la presión intracraneal por infusión de líquido cefalorraquídeo artificial a una presión superior a la tensión arterial (PULSINELLI, 1992). Como inconvenientes de los modelos de isquemia global completa están su alta mortalidad y dificultad en la reanimación, el precisar ventilación artificial al estar incluidos los centros respiratorios del tronco cerebral en el área de isquemia y el añadirse isquemia a otros órganos cuyo mal funcionamiento (corazón, pulmones) durante la recirculación puede empeorar la isquemia cerebral.

En la isquemia cerebral incompleta o bihemisférica, la perfusión del tronco cerebral y cerebelo solo está leve o moderadamente disminuída. Ello permite mantener una respiración espontánea. Se consigue por torniquete cervical (que no ocluye las arterias vertebrales ni espinales protegidas, por el estuche óseo vertebral), por hipotensión aislada o por hipotensión añadiendo oclusión de las carótidas solas o de las carótidas y vertebrales (oclusión de cuatro vasos que no es completa al permitir circulación colateral procedente de las arterias espinales), siendo éstos últimos modelos combinados los utilizados con más frecuencia cuando se pretende una isquemia bihemisférica transitoria.

.. Cuando la isquemia global es incompleta (como la que observamos en clínica humana por una hipotensión prolongada), el daño histológico se localiza en "territorios frontera" entre los grandes vasos intracraneales (arterias cerebral anterior, media y posterior), donde la presión de perfusión es más baja. En análisis bioquímico, también la deplección energética y el acúmulo de ácido láctico se produce preferentemente en algunas zonas.

Cuando la isquemia global es completa se produce, tanto en animales como en seres humanos, el daño irreversible de neuronas muy vulnerables que se ha llamado "necrosis neuronal isquémica selectiva". Así las neuronas estriatales intermedias, las neuronas piramidales de la zona CA₁ del hipocampo, las neuronas de las células de Purkinje, y las neuronas piramidales de las capas neocorticales III, V y VI, son especialmente vulnerables a la isquemia (PULSINELLI, 1992) y se van dañando por ese orden en isquemias progresivamente más prolongadas

(PULSINELLI, 1982b). Tras la reperfusión, las neuronas sufren una microvacuolización a los 15 minutos que ha desaparecido a la hora, pero en una segunda fase sufren un daño progresivo en las siguientes 6 horas, y se desintegran a las 48-72 horas.

Al reperfundir también se produce una hipoperfusión progresiva, que puede ser revertida por antagonistas del calcio, aunque éstos tienen poco efecto en la recuperación neurológica. La reperfusión restaura rápidamente los depósitos de alta energía, por lo que ni el fallo energético ni la hipoperfusión son los responsables del daño progresivo que se produce durante la misma.

Los modelos de isquemia focal como puede ser el producido por oclusión de la arteria cerebral media, se asemejan al accidente cerebrovascular de los seres humanos y en ellos se mantiene la oclusión de 3-6 horas (5-15 minutos en la isquemia global), produciéndose por esta mayor dureción un infarto con necrosis no solo de las neuronas sino de la glía y células endoteliales (necrosis neuronal selectiva en la isquemia global). En isquemia focal el infarto se manifiesta desde las seis horas, mientras que en isquemia global deben pasar uno a siete días de recirculación para que aparezca la necrosis neuronal selectiva. Cuando a un modelo de isquemia global se le añade hiperglucemia o hipertermia, el daño neuronal selectivo pasa a convertirse en infarto, y aumentan las estructuras dañadas, como el córtex cingular y la pars reticulata de la sustancia negra.

Un hecho inesperado que se ha hallado en la reperfusión es la "hipoperfusión retardada": al revertir la isquemia, se produce inicialmente un aumento de flujo sanguíneo cerebral por encima del normal ("hiperemia reactiva"), y a los 5-10 minutos se produce una caída al 50% del flujo de los controles ("hipoperfusión retardada") (PULSINELLI, 1982c).

Cuando la isquemia global dura más de 10 minutos, existen algunas áreas que no se reperfunden al restaurar la circulación lo que se ha llamado fenómeno de "no reflujo". Esta situación es reversible cuando la isquemia es breve, pero no lo es cuando dura más de 30 minutos (AMES, 1968; KAGSTROM, 1983a). Cuando la isquemia es incompleta por el contrario, no se presenta el fenómeno de "no reflujo",

aunque sí la hiperemia reactiva y la hipoperfusión retardada (KAGSTROM, 1983b).

A.3.2.4 ISQUEMIA CEREBRAL REGIONAL EXPERIMENTAL.

La vascularización del cerebro de la rata y del ser humano es bastante similar, lo que hace que la rata sea un modelo idóneo para estudiar la isquemia cerebral focal. Otro motivo importante es su bajo coste, razones por las que la rata es el animal más utilizado.

El polígono de Willis consiste en una conexión de la circulación carotídea con la vertebrobasilar por arterias comunicantes en la base del cerebro que es el elemento más característico de la anatomía vascular cerebral. Dicho polígono tiene los mismos elementos en la rata (**Figura 1A, 1B**) que en el ser humano, y da origen a los mismos vasos. Entre ellos está la *arteria cerebral media* que ocluimos en nuestro experimento y cuya obstrucción en el ser humano ocasiona la mayoría de los infartos cerebrales graves.

Los modelos en animales que ocluyen un vaso intracraneal (isquemia cerebral focal o regional) son el equivalente experimental del accidente cerebrovascular (ACV) de los seres humanos. En dichos modelos, la reducción del flujo cerebral es menor que en los experimentos de isquemia global y es variable espacialmente según los modelos, pero dura horas y frecuentemente es permanente, por lo que produce pannecrosis.

En el centro de la zona vascularizada por la arteria ocluida, es donde la reducción de flujo es máxima (aunque no suele ser de cero), y alrededor hay una zona con hiperemia durante las primeras horas tras la oclusión. La dinámica temporal y espacial en la isquemia cerebral focal varía tanto entre los diferentes pacientes como entre los diferentes modelos animales. Las oclusiones producidas en el hombre por embolismo o trombosis local, a veces se organizan y se hacen permanentes, pero más habitualmente se lisan por mecanismos fibrinolíticos fisiológicos y abren el vaso en 6-12 horas.

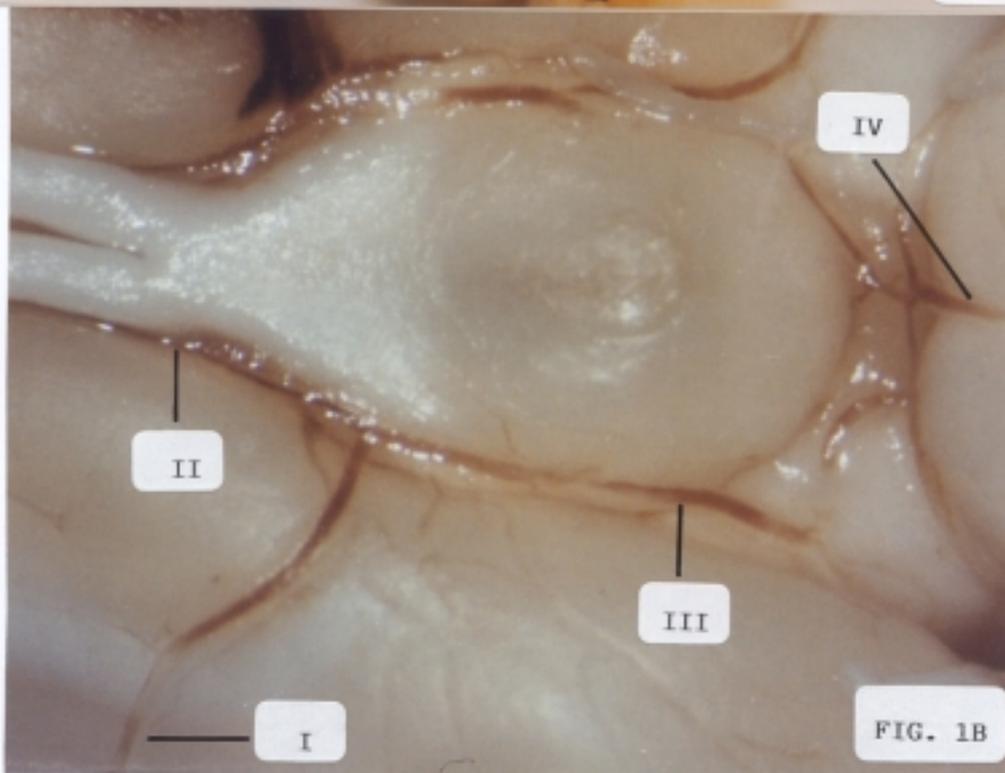
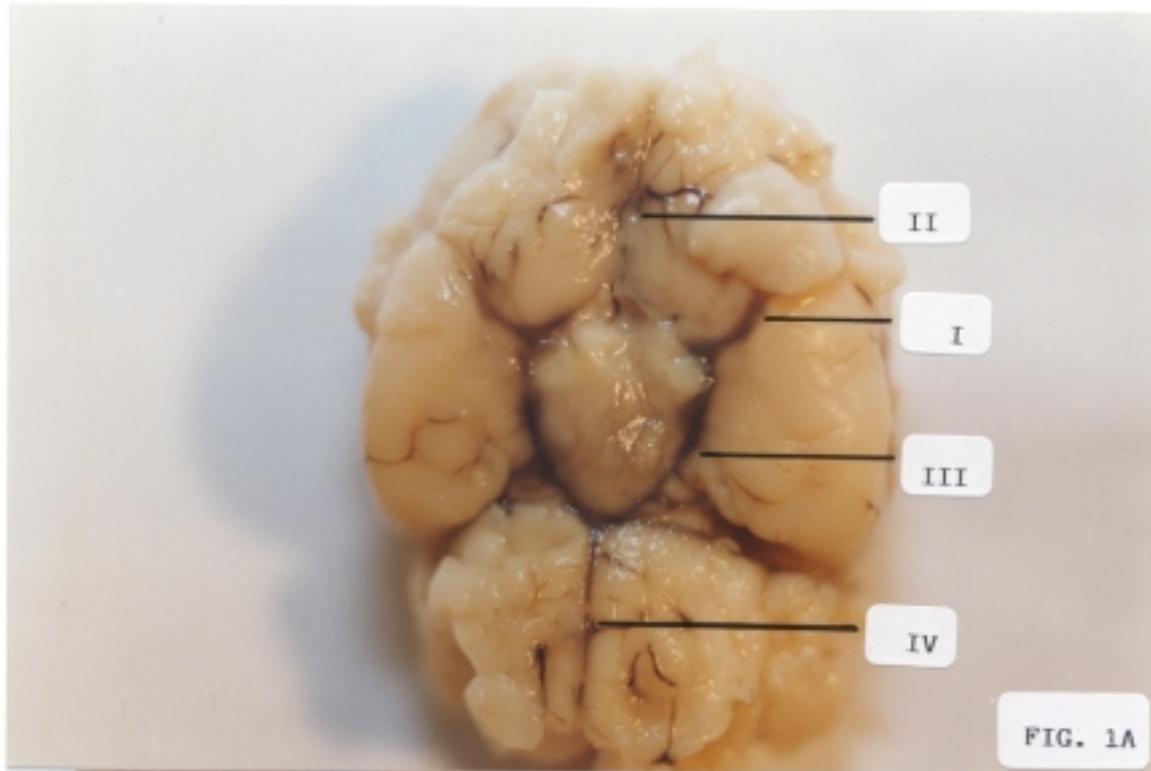


Figura 1. Polígono de Willis de la rata (Fig. 1A de la superficie basal o inferior del cerebro, y 1B, ampliación del polígono de Willis. I, arteria cerebral media; II, arteria cerebral anterior; III, arteria comunicante posterior; IV, arteria basilar.

Se produce entonces una reperfusión cuyo patrón es más variable que el de la isquemia global transitoria. La hiperemia reactiva inicial seguida por la hipoperfusión retardada pueden o no producirse. Durante las cuatro primeras horas se produce un aumento de resistencia vascular y disminución de flujo que se correlaciona con la formación progresiva de edema. De esta manera, el edema puede comprimir capilares y aumentar el área de isquemia (HUDETZ, 1985).

En animales experimentales, cuando la oclusión vascular focal dura una hora, siempre se produce infarto, si la oclusión se mantiene más tiempo, el tamaño del infarato va aumentando de forma concéntrica hasta ocupar todo el territorio del vaso ocluido. El mayor infarto se consigue a las 3-4 horas de oclusión en la rata (JONES, 1981), y a las 4-8 en primates anestesiados, aunque en animales despiertos este tiempo podría ser menor (KAPLAN, 1991). En el ser humano no se conocen estos datos, pero se supone que se pueden extrapolar los del primate (PULSINELLI, 1992).

Por ser técnicamente más sencillo que la oclusión intracraneal de la arteria cerebral media, se intentaron producir infartos cerebrales experimentales en la rata ocluyendo la carótida en el cuello, lo que se ha desechado, porque al igual que en el hombre, en la rata produce resultados impredecibles. En el ser humano, puede producirse un infarto masivo o cursar de forma totalmente asintomática, dependiendo de la circulación colateral. En el ser humano esta circulación colateral se produce a nivel de polígono de Willis y anastomosis leptomeníngicas y en la rata además, por uniones colaterales dorsales entre las ramas terminales de las arterias cerebrales anterior, media y posterior que no desaparecen en la vida neonatal como lo hacen en el hombre (COYLE, 1982b). Por ello, la oclusión carotídea en la rata solo produce infartos consistentes si se le añade hipotensión o hipoxia, nuevas variables que pueden interferir en el experimento produciendo alteraciones metabólicas generalizadas o deteriorando la función cardiopulmonar. Así en un experimento, la ligadura bilateral de ambas carótidas en la rata redujo el flujo sanguíneo cerebral al 50%, pero no produjo un fallo energético apreciable, para lo que hubo que reducir la presión arterial a 100 mm. Hg. Por otra parte, la oclusión de la arteria basilar de la rata en un punto, no produce infarto cerebral debido a la circulación colateral (WOJAK, 1991).

Para conseguir infartos cerebrales con la oclusión aislada de la arteria carótida, se han utilizado otros animales de experimentación como es un ratón del desierto llamado gerbo (Mongolian gerbil), cuya circulación colateral es deficitaria. La oclusión de la arteria carótida en este animal produce infartos cerebrales en un 40% de los casos aproximadamente, al ser la vascularización cerebral variable (depende de que exista o no conexión entre ambas arterias cerebrales anteriores) (BERRY, 1975), el tamaño del infarto no es homogéneo, y se acompaña de una importante mortalidad (KAHN, 1972), por lo que no es un modelo enteramente satisfactorio. Como los resultados clínicos, histopatológicos y metabólicos son variables, han de subdividirse los animales en los que tienen síntomas o un "perfil isquémico completo" y los que no lo tienen, y aun en el primer grupo una isquemia de nueve horas no deplecciona de glucógeno ni disminuye el ácido pirúvico (aunque sí cae la glucosa y aumenta el ácido láctico), por lo que la isquemia ha de ser incompleta (MRSJULA, 1975). Por la variabilidad entre los individuos de un mismo grupo, se necesitan al menos 20 animales por grupo experimental (CLIFTON, 1989).

Aunque entrañan una dificultad técnica mucho mayor que la oclusión de la arteria carótida en el cuello, los mejores modelos de isquemia cerebral consisten en la oclusión de una rama intracraneal de la carótida, en concreto la arteria cerebral media en las ratas, lo que evita la circulación colateral compensatoria e impredecible en el polígono de Willis. La oclusión de la arteria cerebral media en primates es un modelo adecuado pero que se ha utilizado poco por razones económicas y éticas. Otro inconveniente es la variabilidad en el tamaño del infarto que se produce en monos (CROWELL, 1981).

Por ello uno de los modelos de isquemia focal más utilizados y aceptados actualmente es la oclusión microquirúrgica de la arteria cerebral media de la rata por craneotomía subtemporal bajo el cigoma, siguiendo la técnica de TAMURA (TAMURA, 1981a). Cuando la oclusión se hace en dos puntos: 2 mm. proximal a la cintilla óptica (para incluir a las arterias lentículoestriadas) y tras la intersección de la arteria cerebral media con la vena cerebral inferior, y se corta el vaso para evitar la recanalización, se produce infarto en el 100 % de los casos, y éste es homogéneo en cuanto a extensión y localización, incluyendo la zona infartada no

sólo cortex cerebral sino también ganglios basales al quedar ocluidas también las ramas lenticuloestriadas de la arteria cerebral media (BEDERSON, 1986a). El flujo queda reducido al 15 % de los controles (TAMURA, 1981b). El principal inconveniente de éste modelo, es su dificultad, al precisar de craneotomía y por el pequeñísimo tamaño de un vaso como la arteria cerebral media (0,3 mm. de grosor aproximadamente) y su mala accesibilidad al ser necesario ocluirla muy proximalmente, prácticamente en la base craneal, pues si se ocluye más distalmente, por encima de la fisura rinal (lo que facilita la técnica), no se produce infarto cerebral de forma consistente (COYLE, 1982a), y el infarto se limita a la corteza, no incluyendo el caudoputamen.

La oclusión de la arteria cerebral media según técnica de TAMURA es el modelo experimental de isquemia focal más utilizado hoy en día porque tiene una gran consistencia, con mínimas variaciones entre laboratorio y laboratorio (GINSBERG, 1989), se conoce bien la localización del daño histológico y los cambios hemodinámicos que produce (TYSON, 1984). La oclusión no es reversible. Por todo ello es el modelo que hemos utilizado en nuestros experimentos.

En otros modelos de oclusión más distal de la arteria cerebral media, como es el de las ratas espontáneamente hipertensas, es necesario añadir la oclusión simultánea de la carótida común homolateral, y en las ratas Long-Evans normotensas, ocluir permanentemente la carótida común homolateral y transitoriamente la contralateral (GINSBERG, 1989).

Para que exista reperfusión se utiliza otro modelo focal de isquemia que es reversible, y que consiste en introducir un hilo dental en la carótida hasta llegar al origen de la arteria cerebral media que queda ocluida, y al retirar el hilo dental se produce la reperfusión. En este modelo se produce necrosis neuronal selectiva en el caudoputamen a los 15 minutos, infarto en el caudoputamen y necrosis neuronal selectiva en la corteza a los 30 minutos, e infarto en ambas localizaciones a los 60 minutos (MEMEZAWA, 1992).

En la rata, con la reperfusión de modelos focales tras 120 minutos de oclusión, el área de infarto queda de igual tamaño que si no se hubiera reperfundido.

Ello ha mostrado que la "ventana terapéutica" durante la que una reperfusión puede salvar tejido cerebral, no dura más de dos horas, a diferencia de otras especies como los gatos en las que la reperfusión en dos horas ha evitado el infarto cerebral y la reperfusión en tres - seis horas lo ha evitado en los monos (SUNDT, 1966; SUNDT, 1972). Estas diferencias tal vez reflejen diferentes circulaciones colaterales.

En los modelos focales, el infarto comienza por el caudoputamen que parece ser menos resistente a la isquemia que la corteza. Respecto a los vasos dentro del área isquémica, se produce daño de las células endoteliales y musculares lisas a las seis horas de la isquemia focal irreversible en la rata, pero cuando hay reperfusión bastan con dos horas, y al romperse así la barrera hematoencefálica, aumenta el edema cerebral (NISHIGAYA, 1991).

Como tanto en los globales incompletos como en los focales, existe circulación colateral (a diferencia de la isquemia global completa), resulta difícil precisar si las variables que introducimos para reducir el la extensión del infarto, actúan sobre el tejido cerebral o sobre la circulación colateral que le llega.

La evolución histológica de la isquemia cerebral focal en la rata con el paso del tiempo está bien estudiada (GARCIA, 1993): a las seis horas del infarto todavía no se ha producido necrosis coagulativa, pero las células tienen una forma festoneada (producida por retracción del contorno celular que está rodeado de vacuolas), así como retracción celular y edema, y a las 12 horas se produce eosinofilia y cariorrexis neuronales.

Estos cambios se inician en el área preóptica a los 30 minutos de isquemia, siguen por los ganglios basales (caudoputamen) y después se extienden a la corteza. También los astrocitos son afectados por la isquemia, incluso de manera más precoz que algunas neuronas. Así, cuando solo hay mínimas alteraciones neuronales, ya hay desintegración de los astrocitos del área preóptica y tumefacción nuclear y citoplásmica de los del caudoputamen, aumentando la reactividad a la proteína astrocítica glial fibrilar de las cuatro a seis horas en el límite entre el tejido sano y el isquémico. A las 24 horas la mayoría de las ratas tienen todo el territorio de la arteria cerebral media lesionado, con retracción neuronal y tumefacción astrocítica,

pero en algunas la lesión cortical está restringida a las capas II a V. También a las 24 horas muchas neuronas y astrocitos aparecen eosinofílicos ("neuronas rojas"), con núcleo picnótico (lo que indica muerte celular), y a las 48 horas la mayoría han perdido la afinidad por la hematoxilina, que ya no tiñe los ácidos nucleicos ("células fantasmas"). A los 3 días se encuentra una panecrósisis con toda el territorio de la arteria cerebral media homogéneamente pálido y con infiltración por polimorfonucleares. A pesar de la evolución morfológica referida, el área de necrosis a las 6 horas no aumenta de una manera significativa hasta las 72 horas (GARCIA, 1993). Las vacuolas del neuropilo corresponden a procesos astrocíticos tumefactos y a terminales neuronales presinápticos vacuolados.

A.3.3 CIRCULACION Y METABOLISMO DURANTE LA ISQUEMIA CEREBRAL.

La recuperación o las secuelas tras un período de isquemia cerebral pueden evaluarse de varias maneras: clínicamente (pero no es fácil evaluar los déficits neurológicos en animales y por lo tanto no es un método sensible), midiendo los metabolitos tisulares como el ATP, fosfocreatina y ácido láctico (pero puede existir metabolismo normal con función alterada), por métodos que miden las funciones fisiológicas como el EEG o los potenciales evocados (pero estos parámetros pueden recuperarse aun existiendo importantes lesiones) o histopatológicamente (lo que tampoco informa sobre la función sino sobre la integridad anatómica necesaria para que se conserve la función). Como ninguno de estos métodos es totalmente satisfactorio, es necesario combinarlos.

Se creía que las neuronas no podrían sobrevivir tras períodos de isquemia de más de 5 minutos debido a la falta de oxígeno. Sin embargo se ha visto que en determinadas condiciones las neuronas pueden tolerar períodos de 15-30 minutos de isquemia y que el daño neuronal se debe no sólo al período de anoxia sino a un período secundario de metabolismo energético alterado que puede continuar incluso tras una adecuada reoxigenación.

La falta de oxígeno y glucosa provoca el fallo energético, que en isquemia cerebral global y focal es cualitativamente similar: desaparición del ATP y fosfocreatina y aumento de ácido láctico y AMP. Cuando la presión de perfusión cae por debajo de 25 mm. Hg. los cambios metabólicos son también cuantitativamente iguales (SIESJÖ, 1978). En los modelos focales, el ATP cae lentamente a un 30% del basal en tres horas y el lactato, tras un brusco aumento inicial, se incrementa lentamente hasta ocho veces el valor normal (MICHENFELDER, 1971). Ello contrasta con los modelos de isquemia global en los que el ATP cae en cuatro minutos a un 50% del normal y a pesar de ello, se pueden prevenir lesiones definitivas si se restaura el flujo durante este tiempo.

El grado de disminución de flujo y de fallo energético son importantes, pero no son los únicos factores que determinan la lesión histológica, pues aunque ambos están más disminuidos en los modelos de isquemia globales, la lesión celular es menor que en los modelos focales. En los modelos de isquemia global completa el flujo es casi cero, pero pueden ser reversibles si duran menos de cinco minutos, por lo que el tiempo es otra variable importante. En cambio, en un modelo de isquemia focal por oclusión de la arteria cerebral media en el mono ardilla que produce de forma consistente un infarto cerebral, el flujo en el centro de la zona isquémica sigue siendo del 20-50% del normal. La reperfusión, con sus cambios metabólicos acompañantes también puede condicionar un aumento del área lesionada por la isquemia.

Puesto que no solo la falta de ATP, sino el metabolismo posterior a la isquemia parece influir en la lesión, se han planteado las preguntas: ¿es el cerebro más vulnerable en condiciones de hipermetabolismo?; ¿es menos vulnerable en condiciones de hipometabolismo?.

Como modelo de hipermetabolismo se han estudiado las convulsiones producidas en la rata por la bicuculina. En esta situación, el metabolismo cerebral se multiplica por tres, y la disminución de presión arterial suficiente para producir silencio eléctrico cerebral no lo produce en animales que no convulsionan, por lo que este modelo de hipermetabolismo parece disminuir la tolerancia a la isquemia (ASTRUP, 1981). Es conocido que los barbitúricos disminuyen el metabolismo

cerebral. Sin embargo, la administración de pentobarbital en el modelo de isquemia focal del babuino no ha tenido efecto sobre el flujo sanguíneo umbral bajo el cual se produce fallo eléctrico ni bajo el que se produce fallo de membrana (BRANSTON, 1979).

Otras situaciones de hipometabolismo que pudieran rebajar estos flujos umbrales podrían tener gran interés para proteger el cerebro isquémico, lo cual tiene una particular importancia, dado que el cerebro es un órgano que se lesiona tan rápidamente cuando le falta el flujo sanguíneo, que raramente podría restablecerse éste antes de que el cerebro se hubiera lesionado. Además se sabe que el deterioro no dependiente del flujo continúa horas o días.

Por ello se estudian en este trabajo otras situaciones de hipometabolismo (hipoglucemia, hipotermia) e hipermetabolismo (hiperglucemia) y se relacionan con el volumen de infarto cerebral para contrastar la hipótesis de que dichas situaciones actúan como protectoras o deteriorantes del cerebro isquémico respectivamente.

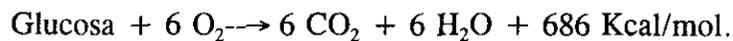
A.4 GLUCEMIA E ISQUEMIA CEREBRAL.

A.4.1 METABOLISMO CEREBRAL NORMAL DE LA GLUCOSA.

El cerebro tiene una actividad menos visible que los órganos que producen trabajo mecánico o tienen actividad secretora. Aunque solo constituye un 2 % del peso corporal, utiliza un 20% del gasto cardíaco debido a sus altos requerimientos de energía, y consume 500-600 ml. de oxígeno (un 20 % del utilizado por el organismo) y 75-100 mg. de glucosa cada minuto, lo que equivale al 20 % de la energía que se produce en reposo (GALE, 1980). El 75% de la glucosa consumida en el cerebro es utilizada por las neuronas (SIESJÖ, 1978). Los depósitos de glucógeno son mínimos y las células son muy sensibles a la falta de oxígeno o glucosa por lo que ha recibido mucha atención el metabolismo energético cerebral

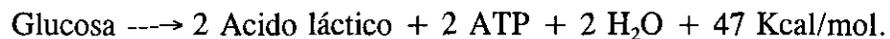
de estos dos compuestos, especialmente dado que el daño cerebral irreversible se produce desde los 5 min. de interrupción de flujo sanguíneo cerebral (y de sustratos energéticos) y que las células del sistema nervioso tienen escasa capacidad regeneradora.

El metabolismo oxidativo de la glucosa en las mitocondrias produce energía de la siguiente manera:



El 67 % de esta energía se utiliza en la síntesis de 36-38 moles de ATP por mol de glucosa, y el resto se desprende en forma de calor. La glucosa es oxidada en su mayoría a CO_2 y agua, y una pequeña parte sigue la vía anaerobia a lactato (16%) y piruvato (2%).

Por el contrario, en ausencia de oxígeno (como sucede en la isquemia), el rendimiento de energía es mucho menor (47 Kcal/mol por mol de glucosa que se utilizan en sintetizar 2 moles de ATP), y se produce ácido láctico según la siguiente reacción:



La energía de la reacción oxidativa de la glucosa se acumula como fosfatos de alta energía (ATP o GPT), que serán utilizados por la célula siempre que lo requiera: en biosíntesis o transporte activo. En el transporte activo solo se utiliza el ATP; pero en el transporte axoplásmico o en biosíntesis, se utilizan también otros fosfatos de nucleósido (UTP, CTP, GTP) que luego son recargados por el ATP (SIESJÖ, 1978). Los depósitos de ATP son muy escasos y si no se repusieran se agotarían en 12 segundos de metabolismo normal, según se ha calculado en el cerebro de rata. El ATP se almacena en forma de fosfocreatina, pero tampoco estos depósitos duran más de 20 segundos por lo que es fundamental el metabolismo oxidativo continuado.

El paso de la glucosa a través de la barrera hematoencefálica no se produce por difusión ni por transporte activo dependiente de energía, sino por transporte facilitado que no consume energía. El transporte facilitado se caracteriza por la existencia de una molécula transportadora de alta afinidad con una K_m 0,25 mM/L aproximadamente (COX, 1983), y por realizarse en ambos sentidos de la barrera, a favor del gradiente de concentración. Este tipo de transporte llega a saturarse aumentando las concentraciones del sustrato y lo pueden antagonizar otras sustancias que se unan al transportador. El paso del espacio extracelular cerebral al interior de las células se produce rápidamente, por lo que a efectos prácticos, la barrera hematoencefálica es el principal obstáculo entre la sangre y el tejido cerebral. Un consumo tisular de glucosa aumentado (como sucede en el "status epiléptico") aumentará el gradiente entre la concentración de la sangre y el tejido cerebral, y por lo tanto el transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica. Un consumo disminuido de glucosa (la anestesia barbitúrica disminuye el consumo tisular de glucosa en un 50 %), reducirá dicho gradiente y por lo tanto, el transporte.

La concentración de glucosa en el LCR es el 65 % de la glucemia plasmática en el hombre, pero en la rata es solo de un 33 % . En ambos, la glucosa en LCR varía linealmente en un rango muy amplio con las modificaciones de la concentración de glucosa en sangre. Probablemente el mayor gradiente sangre-LCR es el responsable de que el transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica sea más rápido en la rata que en el hombre (aunque no se puede descartar una diferente velocidad máxima por un mayor número de transportadores). Ese mayor gradiente en la rata puede ser el resultado de un mayor consumo cerebral, pues mientras que el cerebro humano consume $0,27 \mu\text{moles/gr./min.}$ de glucosa, el consumo de la rata es al menos el doble, observándose en los animales de experimentación que el consumo cerebral de glucosa es inversamente proporcional al tamaño del animal. Al ser la concentración normal de glucosa en la mayoría de los animales ligeramente inferior a la K_m , la entrada de glucosa en el cerebro depende sobre todo de su concentración en la sangre.

En condiciones normales la glucosa es prácticamente el único sustrato que utiliza el cerebro, pero cuando aumentan las concentraciones de cuerpos cetónicos

(β -hidroxibutirato, acetoacetato) como en el ayuno (OWEN, 1967) o la cetoacidosis, éstos pueden llegar a suponer hasta el 60 % del sustrato, especialmente en el cerebro inmaduro, lo que se ha comprobado tanto en animales de experimentación como en el hombre. Los cuerpos cetónicos utilizan el mismo transportador de ácidos monocarboxílicos que el lactato, y este transportador aumenta su capacidad con el ayuno.

Aunque se sabe que en el músculo la insulina aumenta el transporte al interior del tejido, en el caso de la barrera hematoencefálica no existe consenso sobre su acción. En las ratas hechas diabéticas cuya hiperglucemia se normaliza con insulina, los niveles de glucosa cerebrales permanecen altos, por lo que el cerebro diabético podría tener una alteración en el manejo de la glucosa (HOFER, 1991).

A.4.2 METABOLISMO DE LA GLUCOSA DURANTE LA HIPOGLUCEMIA.

La insulina produce hipoglucemia preferentemente aumentando la captación de glucosa por el músculo y tejido adiposo y de forma secundaria disminuyendo la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática.

Tras provocar una hipoglucemia en la rata, los niveles cerebrales de glucosa tardan algo más que los de la sangre en disminuir y la glucosa en el LCR tarda 45 minutos en igualar la de la sangre (FEISE, 1976).

La hipoglucemia tiene efectos generales sobre el organismo a través de los sistemas simpático y adrenal, cuya descarga produce taquicardia e hipertensión. En la rata, si la hipoglucemia es acentuada y duradera, dicha descarga puede producir edema o hemorragia pulmonar y muerte (AUER, 1984).

Pero los efectos más importantes de la hipoglucemia se producen en el cerebro, pues la glucosa es el único combustible que pueden utilizar las neuronas en condiciones normales. Como se ha referido, el consumo de glucosa por el cerebro humano es de $0.27 \mu\text{mol./gr./min.}$ y la entrada en las células depende del gradiente

de concentraciones entre la sangre y el interior celular. Cuando se produce una hipoglucemia, inicialmente se reduce este gradiente, y por lo tanto el transporte. Más tarde, en el interior de la célula se sigue metabolizando glucosa y disminuye su concentración, por lo que el gradiente y transporte se restablecen. Cuando la hipoglucemia es moderada, aumenta la velocidad de transporte a través de la barrera hematoencefálica (Mc CALL, 1986) de manera que se mantiene el consumo cerebral de glucosa. Ello probablemente se consigue al abrirse lechos capilares que antes no eran funcionantes y aumentar así el número de transportadores posibles para la glucosa (CREMER, 1983), pues también el flujo cerebral está aumentado en condiciones de hipoglucemia (NEIL, 1987), probablemente por ello hay pacientes que toleran bien la hipoglucemia crónica. Pero cuando la glucosa cae a cifras muy bajas, este mecanismo compensatorio ya no es suficiente, y disminuye el consumo intracelular de glucosa (NORBERG, 1974). Sin embargo, el consumo de oxígeno prácticamente no disminuye (al utilizarse, como veremos, otros sustratos) y tampoco lo hace el flujo sanguíneo cerebral (EISENBERG, 1962; CILLUFO, 1982). Por el contrario, en la hiperglucemia crónica se ha encontrado disminuido el transporte de glucosa al cerebro.

Monitorizando el EEG durante la hipoglucemia, solo hay una disminución en el consumo de glucosa (de hasta un 40 %), cuando el EEG se hace isoelectrico, y el animal entra en coma, lo que sucede con una glucosa de 1 $\mu\text{mol/ml}$ en plasma (18 mgr./dl), y por debajo de estas cifras, también disminuye la concentración de ATP y fosfocreatina tisular. El coma por hipoglucemia es el único caso en el que la pérdida de conciencia no se asocia en un principio a disminución de consumo de oxígeno, aunque si se mantiene una hipoglucemia extrema, acaba disminuyendo. El flujo cerebral al principio está aumentado, pero luego también disminuye, al igual que la autoregulación y la reactividad de los vasos cerebrales al CO_2 (NILSSON, 1981).

De cualquier manera, los principales depósitos energéticos durante la hipoglucemia son los de glucosa y glucógeno. En la rata, con una glucemia plasmática de 7 $\mu\text{mol/ml}$ (126 mgr/dl), la concentración tisular de glucosa es de 3 $\mu\text{gr/gr}$ y la de glucógeno de 2 $\mu\text{gr/gr}$. Con un consumo de glucosa de 0'8 $\mu\text{gr/ml}$ éste supone reservas para menos de 10 minutos si no se sigue aportando glucosa. En

el ser humano, el consumo de glucosa es menos rápido y los depósitos de glucógeno parecen ser mayores, por lo que el metabolismo oxidativo se mantiene más tiempo (SIESJÖ, 1978). Otros compuestos del ciclo de Krebs se utilizan en menor medida como sustratos energéticos durante la hipoglucemia. El lactato y piruvato parecen estar disminuidos.

Cuando se reduce la glucemia por debajo de 2 $\mu\text{mol/ml}$ (36 mgrs/dl), la diferencia arteriovenosa de glucosa (que refleja la glucosa consumida por el cerebro) es menor que la diferencia arteriovenosa de oxígeno, lo que indica que se consumen otros sustratos energéticos. Así aumenta la captación cerebral de β -hidroxibutirato (GHAJAR, 1982), de lactato (GARDINER, 1980; HERNANDEZ, 1980) y cuando no es suficiente por ser la hipoglucemia muy pronunciada, el cerebro comienza a consumir intermediarios del ciclo del ácido cítrico, aminoácidos, e incluso fosfolípidos estructurales (esfingomielina, lecitina...), lo que no sucede en normoglucemia. El contenido de fosfolípidos tisulares disminuye por este motivo en un 8 %, liberándose ácidos grasos libres que se multiplican por seis (AGARDH, 1981a). Uno de estos ácidos grasos libres es el ácido araquidónico, cuya toxicidad en situaciones de isquemia cerebral grave citamos previamente.

En cuanto a los aminoácidos: la alanina, glutamina y GABA son transformados en glutamato que se degrada a aspartato y α -cetoglutarato, del cual se extrae energía oxidativa en el ciclo del ácido cítrico. Pero ello se hace a expensas de un aumento en la concentración de amoníaco (GHAJAR, 1982) y un cambio en las concentraciones de aminoácidos neurotransmisores: disminución del glutamato (GIBSON, 1976) y aumento del aspartato, dopamina, noradrenalina y serotonina (GARCIA YEBENES, 1984), mientras que la acetilcolina no se modifica (GORELL, 1981). Este cambio en la concentración de transmisores podría ser responsable de la sintomatología de la hipoglucemia y de las ondas lentas en el EEG, por un trastorno de la transmisión sináptica, cuando la hipoglucemia no ha llegado a cifras tan bajas como 1 $\mu\text{mol/gr}$. y por tanto todavía no se ha producido deplección energética. El aumento en la concentración de neurotransmisores excitatorios (aspartato), también se ha postulado como responsable del daño neuronal específico de la hipoglucemia, que se produciría por un mecanismo excitatorio (excitotoxicidad) más que por deplección energética.

A pesar de todo, éstos cambios metabólicos compensatorios no son suficientes para cubrir las demandas metabólicas de energía del cerebro, pues en estas condiciones se produce una oxidación del NADH y aumento del NAD (BRYAN, 1986).

La acción de la hipoglucemia sobre el flujo cerebral es discutida: para algunos aumenta el flujo cerebral en la rata en casi todas las regiones cerebrales excepto en el lóbulo posterior de la hipófisis que no está protegido por la barrera hematoencefálica y a donde podrían llegar sustancias de la circulación sistémica que lo impidieran (BRYAN, 1987). Otros en cambio no han encontrado alteraciones del flujo cerebral en la ternera (GARDINER, 1980), en el perro recién nacido (HERNANDEZ, 1980) y tampoco en la rata (GHAJAR, 1982) cuando la hipoglucemia produce estupor, pero lo han encontrado reducido cuando es más profunda y llega a producir coma y daño irreversible (indicado por la incapacidad para regenerar fosfatos de alta energía). En seres humanos este aumento de flujo ha sido encontrado por algunos autores (DELLA PORTA, 1964). Por el contrario, se ha observado que la hiperglucemia aguda o crónica reduce el flujo sanguíneo cerebral (DUCKROW, 1987a).

Al igual que la isquemia, aunque de forma menos pronunciada, la hipoglucemia severa produce un aumento del potasio extracelular y una disminución del calcio extracelular (HARRIS, 1984). A diferencia de la hipoxia, en la hipoglucemia no se produce acidosis láctica dado que el ácido láctico se genera por metabolismo anaerobio de glucosa, sustrato disminuido en la hipoglucemia. Además la hipoxia, actuando durante un tiempo equivalente, produce un mayor deterioro del estado energético.

A.4.3. HIPERGLUCEMIA E INFARTO CEREBRAL.

Comenzaré revisando los datos en seres humanos en los que se han hecho estudios epidemiológicos y pronósticos de la hiperglucemia en el accidente cerebrovascular. Continuaré con los datos de los modelos experimentales.

Es conocido que la hiperglucemia y la diabetes mellitus son un factor de riesgo para la enfermedad cerebrovascular (FULLER, 1983). Así en el estudio de Framingham los ictus trombóticos eran 2,5 y 3,6 veces más frecuentes en varones y mujeres diabéticos respectivamente, que en los que no lo eran (KANNELL, 1979). En el estudio de Copenhage, los ictus que se producían en diabéticos tenían mayor mortalidad, eran más jóvenes y tardaban más en recuperarse (JORGENSEN, 1994). Esta mayor mortalidad se produce sobre todo en la primera semana, probablemente por mayor severidad del infarto o del edema cerebral (OPPENHEIMER, 1985). También se ha encontrado que un mal control de la diabetes mellitus, estimado por las cifras de hemoglobina glicosilada se asocia con mayor frecuencia a ictus, especialmente en mujeres (KUUSISTO, 1994).

Desde hace bastante tiempo es conocido que la diabetes lesiona los vasos y de ésta manera los órganos que éstos irrigan, entre ellos el cerebro. Además de favorecer la aterosclerosis, la diabetes se asocia a múltiples cambios vasculares que pueden favorecer la enfermedad cerebrovascular: disminuyendo la autoregulación, aumentando la viscosidad del plasma, por efecto hiperosmolar de la glucosa (PULSINELLI, 1982c), o disminuyendo la deformabilidad de los leucocitos y aumentando su adherencia al endotelio.

Más recientemente se ha estudiado el efecto que tienen la diabetes y la hiperglucemia no sobre el vaso, sino sobre el tejido cerebral isquémico. En general se empieza a considerar como un factor deteriorante del infarto cerebral, empeorando el pronóstico (GIROUD, 1987) tanto por aumento de su extensión como de su mortalidad (PEINADO, 1984; GRAY, 1989; KIERS, 1992). Los pacientes con una glucemia superior a 120 mg/dl tienen más del doble de probabilidades de morir pronto tras el ictus o quedar con una incapacidad importante (PULSINELLI, 1983c). Esto tiene relevancia clínica, al existir diferentes grados de hiperglucemia en el 30% de los ictus (MELAMED, 1976). Sin embargo siguen existiendo autores que no consideran dañina la hiperglucemia en el infarto cerebral (CAMBON, 1991; MATCHAR, 1992; DEROUESNE, 1993).

Respecto al tipo de infarto y topografía, mientras que algunos encuentran más infartos lacunares en los diabéticos que en los que no lo son, otros no encuentran

relación entre el tipo y localización del infarto y la glucemia (KIERS, 1992), y algunos han hallado más hiperglucemia en ictus hemorrágicos (DE COURTEEN-MYERS, 1992) e infartos de tronco, así como en los casos más severos (MELAMED, 1976). Un estudio de enfermos con obstrucción de la arteria cerebral media, no encontró influencia de la hiperglucemia en el tamaño del infarto cuando no existía circulación colateral, pero cuando existía, la hiperglucemia resultaba perjudicial en los diabéticos pero podía ser beneficiosa en los que no lo eran (TONI, 1994).

Es en animales de experimentación donde, además de estudios pronósticos como en el hombre, se han hecho casi todos los estudios de análisis bioquímico y metabolismo.

Al igual que en el hombre, son también muchos los estudios experimentales que sostienen que la hiperglucemia empeora el tamaño del infarto y la supervivencia, tanto en oclusiones definitivas como transitorias en gatos (DE COURTEN-MYERS, 1985, 1988 y 1989; MYERS, 1987) y en ratas.

Sobre el papel deteriorante de la hiperglucemia, existe consenso aceptado por la mayoría de los autores en los modelos de isquemia global (GINSBERG, 1980; WELSH, 1980; PULSINELLI, 1982a; KALIMO, 1981).

Sin embargo, en modelos de isquemia focal como el que utilizamos, no existe acuerdo, lo que justifica que incluyamos un grupo de hiperglucemia en nuestro trabajo. Así, algunos autores encuentran que al igual que en isquemia global, la hiperglucemia en isquemia focal es perjudicial (NEDERGAARD, 1987c; PRADO, 1987). En el gerbo, la isquemia en hiperglucemia (pero no con otras soluciones hiperosmolares), hace que progrese el déficit neurológico, por lo que podría ser otra causa de infarto cerebral progresivo (VAZQUEZ CRUZ, 1990a), y en el infarto cerebral progresivo en seres humanos, la hiperglucemia en la fase aguda es también un factor determinante de la progresión (DAVALOS, 1990).

Aunque minoritaria, la opinión de que la hiperglucemia es protectora en el infarto cerebral focal experimental es sostenida por varios autores y en diferentes

animales de experimentación como el gato (ZASSLOW, 1989), la rata (GINSBERG, 1987; JERNIGAN, 1984), el gerbo (CLIFTON, 1989), o el conejo (KRAFT, 1990). En animales recién nacidos los resultados son variables, y mientras que la hiperglucemia previa a la isquemia empeora el daño en el cerdo, si se instaura después de la isquemia no la modifica (Le BLANC, 1994), lo que podría deberse a una menor producción de ácido láctico. NERDEGAARD (NERDEGAARD, 1987a) propone que la hiperglucemia tiene un papel protector en la perifería del infarto pero aumenta el tamaño de la zona central.

Midiendo en el cerebro de ratas diabéticas sometidas a isquemia el fosfato de alta energía fosfocreatina mediante espectroscopia por resonancia magnética, se han encontrado dichos depósitos disminuidos en los animales diabéticos mal controlados (hiperglucémicos). En los diabéticos y no diabéticos normoglucémicos, los niveles de fosfocreatina se recuperaban con la reperfusión, lo que también apoya el papel beneficioso de un buen control de la diabetes cuando se produce isquemia cerebral (SUTHERLAND, 1992).

Otros estudios experimentales sobre isquemia e hiperglucemia se han centrado en el flujo y el metabolismo. La hiperglucemia en situación de isquemia, por el consumo del exceso de glucosa en condiciones anaerobias, solo produce dos moléculas de ATP, acumulándose ácido láctico y iones H^+ . Si después de la isquemia prolongada se restaura la circulación de la sangre, puede seguir aportándose glucosa al tejido, producirse más ácido láctico y el daño puede ser mayor que con isquemia completa. Por ello, la hiperglucemia podría empeorar el daño en áreas cerebrales con circulación colateral como la corteza, pero no influiría en zonas arteriales terminales como los ganglios basales (PRADO, 1987). En clínica humana, éste podría ser el caso de los infartos lacunares.

En estudios de tomografía por emisión de positrones en enfermos con infartos cerebrales recientes reperfundidos, al igual que en tejido crónicamente isquémico, se ha encontrado un desacoplamiento entre el consumo regional de oxígeno (que está disminuído) respecto al de glucosa, reflejando una glucólisis anaerobia (BARON, 1984). Además del tejido cerebral, los neutrófilos y macrófagos que llegan a la zona de infarto pueden aumentar la glucólisis (POWERS, 1992).

Respecto al flujo, en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media en la rata, a medida que disminuye el flujo sanguíneo, disminuye la utilización de glucosa. Cuando el flujo es inferior a un 38 % del normal, vuelve a aumentar la utilización de glucosa, ésta vez por metabolismo anaeróbico, con la correspondiente disminución del pH (SAKO, 1985).

Para evitar la hiperglucemia durante la isquemia cerebral, se han buscado otras fuentes calóricas diferentes a los carbohidratos que en el hígado se transforman en glucosa. En este sentido, el 1,3- butanediol (que en el hígado se transforma en β -hidroxibutirato), la triacetina y la tributirina, sustituyendo a carbohidratos convencionales en la dieta de la rata producen un menor daño en su cerebro isquémico que la dieta convencional (ROBERTSON, 1992).

Las hipótesis para explicar cuáles son los mecanismos por los que la hiperglucemia puede empeorar el infarto cerebral se han centrado en el ácido láctico. Este y otros los exponemos en los siguientes apartados.

A.4.4 HIPERGLUCEMIA Y ACIDOSIS LACTICA.

El ácido láctico se produce en condiciones fisiológicas en el organismo (por ejemplo en el músculo por un ejercicio intenso), sin consecuencias, pues puede ser aclarado y transformado en glucosa por el hígado, capacidad de la que carece el cerebro. El ácido láctico producido fuera del cerebro es captado luego por éste utilizando el transporte facilitado con un transportador de ácidos monocarboxílicos. De hecho no se sabe si la mayoría del ácido láctico que se encuentra en el cerebro en condiciones normales tiene su origen en el cerebro, o en el resto del organismo, y es captado por el cerebro. Habitualmente la concentración de ácido láctico en el cerebro es baja, pero en condiciones de isquemia cerebral aumenta y es el propio cerebro el que produce la mayoría del ácido láctico que allí se encuentra.

Como vimos en el apartado A.4.1, en condiciones anaerobias, el metabolismo de la glucosa da origen a 2 moléculas de ATP, a ácido láctico y a H⁺. El ácido láctico se produce en el interior de las células y es habitualmente tamponado por el bicarbonato. El astrocito es la célula con mayores depósitos de glucógeno y la mayor productora de ácido láctico.

Para el hecho paradójico de que la reperfusión pueda producir mayor daño tisular que la isquemia cerebral permanente se ha propuesto la explicación siguiente: el aporte de glucosa por la reperfusión, en una situación de hipoxia-isquemia como puede ser el infarto cerebral haría que el metabolismo de la glucosa fuera anaerobio y se produjera ácido láctico que sería el responsable del mayor daño tisular. De hecho, cuando el ácido láctico tisular no supera lo 15-16 $\mu\text{moles}/100\text{ grs.}$, se observa una recuperación del metabolismo energético cerebral, de la actividad electrocorticográfica y de los potenciales evocados que no se observan cuando la concentración supera los 25 $\mu\text{moles}/100\text{grs.}$ (REHNCRONA, 1981), situación en la que también hay mayores alteraciones histológicas. Cuando se evita la acumulación de ácido láctico, se produce mayor daño en la isquemia cerebral completa que en la que se sigue de reperfusión, lo que también sugiere que la acumulación de ácido láctico es responsable del mayor daño tisular que se encuentra en la reperfusión (DIETRICH, 1987).

Dentro del cerebro isquémico, y debido a la glucólisis anaerobia, las zonas con mayor metabolismo de glucosa son las que tienen más ácido láctico (LOCKWOOD, 1986) lo que se ha encontrado tanto en animales adultos como en recién nacidos (LAPTOOK, 1990). En isquemia seguida de reperfusión, las zonas que recuperan el consumo de glucosa a niveles casi normales mientras el flujo sanguíneo permanece disminuído, son las que sufren mayor daño celular (GINSBERG, 1985).

La glucólisis anaerobia permite que el tejido isquémico cerebral en hiperglucemia tenga mejor conservado el estado energético (ATP, fosfocreatina...) que en normoglucemia, pero paradójicamente, el daño histológico es mayor, lo que se ha atribuído a una mayor concentración de ácido láctico en esta situación (FOLBERGROVA, 1992). Por este motivo, el pH empieza a disminuir por debajo

de un flujo sanguíneo de 63 ml/100 grs tejido/minuto en hiperglucemia, mientras que en normoglucemia disminuye a partir de los 49 ml. (NAKAI, 1988), y además la acidosis intra y extracelular es más acentuada en hiperglucemia (SMITH, 1986). También el flujo sanguíneo y la utilización de la glucosa y oxígeno están reducidas en hiperglucemia (SIEMKOWICZ, 1982) respecto a la normoglucemia.

Otro argumento a favor de que la hiperglucemia deteriora el cerebro isquémico a través del ácido láctico se ha encontrado al mantener elevados los niveles de glucosa pero impedir su metabolismo por el análogo 2-deoxiglucosa que inhibe competitivamente la glucólisis anaerobia, (y por lo tanto la producción de ácido láctico), disminuyendo la mortalidad y convulsiones en un modelo de isquemia global en la rata (COMBS, 1986).

El contenido en glucosa previo a la isquemia determina la severidad del aumento de ácido láctico: cuando la glucemia preisquémica es de 2'4 (hipoglucemia), 7'8 (normoglucemia), y 28 $\mu\text{mol/ml}$ (hiperglucemia), el ácido láctico en el tejido isquémico aumenta a 4'8, 12'1 y 20'7 $\mu\text{mol/gr}$ (LJUNGGREN, 1974).

Un aumento por encima de 20-25 mmol/kg hace imposible la supervivencia neuronal (REHNCRONA, 1980), dado que el pH extracelular baja a 6,2 y el intracelular a 6 (SIESJÖ, 1990). La isquemia en estas condiciones pasa desde una muerte de neuronas selectivamente vulnerables, a una necrosis de todos los elementos celulares, incluyendo glía y vasos (PLUM, 1982), es decir al infarto cerebral. Puede que exista un umbral, pues valores inferiores a 15 mmol/Kg de ácido láctico no parecen empeorar el daño por isquemia.

El incremento de ácido láctico en parte puede ser prevenido por la hipoglucemia, lo que también se ha comprobado "in vivo", por medio de espectroscopia por resonancia magnética (LEVINE, 1988; ROSENBERG, 1991). La normoglucemia o hipoglucemia se asocian a una producción de ATP tisular mayor y más rápida (GARDINER, 1982) y a menor producción de ácido láctico y acidosis tisular (CHOPP, 1988b) e incluso a una alcalosis transitoria (MABE, 1983; CHOPP, 1988b). La hiperglucemia por el contrario impide, cuando se produce la reperfusión,

la recuperación del estado energético y la actividad electrocortical cerebral (REHNCRONA, 1981), y disminuye la propia reperfusión (VENABLES, 1985).

El ácido láctico detectado en pacientes con ACV mediante espectroscopia por resonancia magnética, persiste muchas semanas después del episodio agudo. No se sabe si ello se debe a permanencia del ácido láctico que se produjo en la fase aguda, a persistir el metabolismo anaerobio de la glucosa, o a las células inflamatorias que retiran el tejido necrótico (GRAHAM, 1992).

El ácido láctico puede empeorar el infarto cerebral por varios mecanismos. Uno de ellos es el de los radicales libres mediados por el ión ferroso, que cataliza la peroxidación de los lípidos (SIESJÖ, 1989). El ión hidrógeno tiende además a acumularse en el interior de las células astrogliales, lo que puede contribuir a su necrosis (KRAIG, 1985). La acidosis tisular produce pérdida de la autoregulación vascular y vasodilatación (SUNDT, 1972), lo que puede aumentar el edema cerebral tanto en clínica humana (BERGER, 1986) como en experimentación animal (PULSINELLI, 1982a).

Otros mecanismos posiblemente nocivos de la acidosis láctica son la destrucción de la prostaciclina en medio ácido con efecto resultante vasoconstrictor y proagregante plaquetar que empeora la circulación a nivel de la microvasculatura y la disminución de la utilización de glucosa por la vía aerobia y de la producción de ATP (WELSH, 1983). Este hipometabolismo para la glucosa en el área de infarto, más marcado cuando existe hiperglucemia, se ha comprobado en la clínica midiendo el metabolismo de la ¹⁸fluoro-deoxiglucosa por tomografía por emisión de positrones (KUSCHNER, 1990). También se ha encontrado disminución del flujo cerebral y del pH, pero no del consumo de oxígeno (KITAMURA, 1988).

Se ha propuesto que la acidosis láctica por encima de un cierto nivel produciría destrucción vascular, pues en hipoglucemia y normoglucemia el tejido infartado es invadido por capilares, mientras que esto no se ve en hiperglucemia (NERDEGAARD, 1978b).

Aunque son minoría, hay autores que cuestionan que el papel dañino de la hiperglucemia se deba a la acidosis, pues la acidosis causada por la hipercarbia no tiene un efecto perjudicial. Por ejemplo alimentando con diferentes sustratos a ratas con infarto cerebral experimental, se vió que el tamaño del infarto no estaba relacionado con los niveles de ácido láctico (ROBERTSON, 1992). Además, una acidosis extracelular moderada ha sido protectora para las neuronas enfrentadas con tóxicos como el ácido kaínico, el glutamato o la privación de glucosa y oxígeno en cultivos celulares (GIFFARD, 1990). El glutamato está aumentado durante la isquemia, y la acidosis moderada cerraría los canales de calcio NMDA dependientes que son activados por el glutamato extracelular, y así impediría la entrada de calcio en la célula y la muerte celular. Pero la acidosis láctica también puede ser tóxica para las neuronas al aumentar excesivamente la concentración extracelular de glutamato por inhibición de su recaptación por los astrocitos.

A.4.5 OTROS EFECTOS DE LA HIPERGLUCEMIA.

Además de los mediados por el ácido láctico, otros efectos de la hiperglucemia se ejercen sobre el flujo cerebral y la barrera hematoencefálica. Respecto al flujo, la hiperglucemia reduce el flujo cerebral postisquémico en el gato (GINSBERG, 1980), así como en el ratón, pero ello no es la causa de la disminución del ATP, pues el flujo disminuye en ambos hemisferios mientras que el ATP solo lo hace en el hemisferio isquémico (WELSH, 1983; CHEW, 1991). En ausencia de isquemia, la hiperglucemia aguda o crónica también reduce el flujo cerebral sin que se reduzca el metabolismo (DUCKROW, 1987 a y b).

Otro mecanismo deteriorante de la hiperglucemia podría ser el mayor daño por la isquemia de la barrera hematoencefálica, lo que se ha comprobado experimentalmente por una mayor extravasación de peroxidasa de rábano (DIETRICH, 1993). De esta manera podrían pasar más fácilmente sustancias neurotóxicas al tejido cerebral y aumentar el edema. Por el contrario, otros autores no encuentran que el efecto pernicioso de la hiperglucemia en condiciones de isquemia se deba a daño de la barrera hematoencefálica (SIEMKOWICZ, 1981c).

La hiperglucemia aguda por infusión de glucosa produce más crisis convulsivas y mortalidad en un modelo de isquemia global que la hiperglucemia crónica de las ratas diabéticas por la estreptozocina, por lo que probablemente hay un mecanismo adaptativo a la hiperglucemia crónica (WARNER, 1992). Pero ambas situaciones de hiperglucemia se asocian a un mayor daño por la isquemia que si se normaliza la glucemia por la insulina.

En isquemia transitoria experimental, la hiperglucemia produce hipertermia a las 10 horas de la recirculación. Sin embargo, esta hipertermia no parece ser la causa del mal pronóstico que conlleva la hiperglucemia, sino su consecuencia por daño de los centros cerebrales termoreguladores o liberación de factores que termogénicos por daño tisular, pues al evitar la hipertermia con medidas físicas o farmacológicas, no se evita el aumento de mortalidad que produce la hiperglucemia (UCHINO, 1994).

La hiper y normoglucemia elevan el calcio libre intracelular durante la isquemia focal, y al revertir la isquemia y recircular la sangre, el calcio intracelular desciende a niveles normales en los animales normoglucémicos, pero se mantiene elevado en los hiperglucémicos (ARAKI, 1992). La homeostásis de otros iones en el cerebro sin embargo no parece afectarse mucho por la hiperglucemia (SIEMKOWICZ, 1981b).

Una explicación alternativa al daño aumentado por hiperglucemia en el animal experimental podría ser que se trata de animales en ayunas a los que se les provoca la isquemia y la hiperglucemia, y por lo tanto a una deficiencia de insulina o a una infraregulación de sus receptores (LUNDGREN, 1990).

Cultivos puros de astrocitos en condiciones de hipoxia, sufren menor lesión en hiperglucemia que en normoglucemia (KELLEHER, 1993). Ello podría deberse a que los astrocitos tienen un metabolismo diferente al de las neuronas, y por lo tanto distinta susceptibilidad.

A.4.6 HIPERGLUCEMIA DE ESTRES EN INFARTO CEREBRAL.

MELAMED encontró que existía hiperglucemia en un 28% de los ACV en pacientes no diabéticos conocidos y que su mortalidad era tres veces mayor que la de los normoglucémicos (MELAMED, 1976).

No existe acuerdo sobre la causa de ésta hiperglucemia: si se trata de una diabetes mellitus previa no conocida (OPPENHEIMER, 1985), o se trata de una reacción de estrés al infarto cerebral (WOO, 1988; WOO, 1990; CANDELISE, 1985; MURROS, 1992; CAZZATO, 1991). Para detectar las diabetes no diagnosticadas previamente se ha medido la hemoglobina glicosilada en el momento del ictus ($Hb A1c > 7.8 \%$). Los porcentajes de enfermos diabéticos no conocidos han variado del 6 % (OPPENHEIMER, 1985) al 11,4% (KIERS, 1992) y hasta el 42% (RIDDLE, 1982).

En los enfermos no diabéticos, este aumento de la glucemia se ha interpretado como debido a una respuesta de estrés (MELAMED, 1976) en base a que la glucemia volvía a sus niveles normales en un promedio de tres días y medio tras el ACV. Otros datos en favor de la hiperglucemia como una respuesta al estrés que supone un ACV, son que el grado de hiperglucemia está en relación con la gravedad del infarto cerebral, y que la hiperglucemia se correlaciona con los niveles de la "hormona del estrés" (cortisol) (O'NEILL, 1991; TRACEY, 1993; MURROS, 1993), que además puede interferir con el metabolismo periférico de la glucosa (MYERS, 1981).

Otra posibilidad es que solo los individuos con una diabetes latente tengan una respuesta hiperglucémica al ACV y por ende un peor pronóstico. Ello ha sido sugerido porque otra hormona de estrés como es la norepinefrina no se correlaciona con el nivel de glucemia (VAN KOOTEN, 1993) y porque hiperglucemias ligeras se han asociado a una HbA1c aumentada, lo que indica que la hiperglucemia debe haber existido varios meses antes de producirse el ACV (OPPENHEIMER, 1985). En un estudio, la hiperglucemia transitoria no tenía peor pronóstico que la normoglucemia, y en cambio la diabetes conocida o desconocida antes del ictus

(diagnosticada la desconocida por niveles elevados de HbA1), sí empeoraba el pronóstico (TOPIC, 1989). Otros autores por el contrario, no encuentran que una HbA1 elevada se asocie a una mayor mortalidad, por lo que se incluyen entre los que consideran la hiperglucemia una respuesta de estrés (MURROS, 1992), pues además en muchos casos la hiperglucemia se ha normalizado al cabo de un mes (POWER, 1988).

Estudios clínicos han mostrado que más que la historia de diabetes, es la hiperglucemia en el momento de la instauración de la isquemia cerebral lo que empeora el pronóstico, cualquiera que sea su origen: tanto la hiperglucemia en diabéticos como en no diabéticos. Así, los no diabéticos con hiperglucemia también tendrían peor pronóstico que los diabéticos sin hiperglucemia (HELGASON, 1987). En otros trabajos, tanto la hiperglucemia de estrés como la diabetes conocida o latente aumentan la mortalidad y la severidad del ictus (KIERS, 1992). Como vemos, no existe acuerdo, pues otros investigadores sostienen que la glucosa del ingreso no predice el pronóstico ni la supervivencia (ADAMS, 1987; WOO, 1988).

El nivel de glucemia elevado en pacientes con parada cardiorrespiratoria se ha considerado por unos como signo de mal pronóstico y por otros como resultado de la resucitación cardiopulmonar más intensa en los pacientes más graves (LONGSTRETH, 1986).

A.4.7 HIPOGLUCEMIA EN INFARTO CEREBRAL.

El tratamiento con insulina tanto antes como después de la isquemia, ha reducido la necrosis neuronal en la rata en el cortex, tálamo y sustancia nigra, y ello independientemente del efecto hipoglucémico, al encontrar algunos autores (VOLL, 1991) protección en ratas hechas normoglucémicas con insulina (glucosa + insulina), pero no en ratas normoglucémicas sin insulina.

Ello ha llevado a pensar que la insulina, además de modificar la glucemia plasmática tiene otras acciones directamente sobre el cerebro, disminuyendo las descargas neuronales, antiagregando las plaquetas, y tiene funciones complejas de

regulador celular como las tienen también otros factores de crecimiento. Así, estimula la transcripción de los genes tempranos inmediatos c-fos/c-jun, aumenta la producción de RNA mensajero por el núcleo, induce sistemas enzimáticos para la lipogénesis, activa el complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa, modifica el sistema de señal transcitoplásmico fosfatidilinositol y estimula la respuesta de estrés al calor (TING, 1986). Las acciones de la insulina están mediadas por un receptor de membrana tirosín-quinasa. Por ello el efecto protector de la insulina podría no depender exclusivamente de su papel como hipoglucemiante, sino de su actividad como factor de crecimiento: al activar la transcripción de c-fos que está inhibido en la hiperglucemia (COMBS, 1992); inhibiendo la lipólisis activada por el complejo calcio-calmodulina; estimulando la síntesis de lípidos necesaria para la reparación de la membrana, y desecadenando la producción de "proteínas del golpe de calor" que citamos en el apartado A.3.1 (WHITE, 1993).

Sin embargo NERDEGAARD postula que la insulina no tiene mucho efecto en la extensión de la isquemia focal experimental, pues no encuentra diferencias de extensión en la hiperglucemia de ratas diabéticas (con insulina baja) y ratas no diabéticas a las que se les infunde suero glucosado al 50 % (con insulina alta) (NERDEGAARD, 1987b).

El efecto sobre el flujo cerebral de la hipoglucemia severa, es aumentarlo, así como el H^+ y K^+ extracelular. Al inyectar glucosa, el H^+ aumenta todavía más (LENIGER-FOLLERT, 1984).

La respiración mitocondrial "in vitro" en homogenados de cerebro de rata isquémico se mantiene mejor en hipoglucemia moderada (STRONG, 1985).

Respecto a la isquemia cerebral global (SIEMKOWICZ, 1978), otros autores han encontrado que tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia producen una mayor mortalidad y un menor grado de recuperación funcional que la normoglucemia.

En el infarto de miocardio experimental, la hipoglucemia aumenta el tejido necrótico (LIBBY, 1975).

A.4.8 DAÑO NEURONAL POR HIPOGLUCEMIA.

En el hombre, la hipoglucemia provocada por insulina produce confusión al llegar a los 19 mgrs./100 ml., y coma cuando alcanza los 8 (KETY, 1948).

La hipoglucemia puede producir hemiplejía y síndromes neurológicos focales que revierten al normalizar la glucosa (WALLIS, 1985; FOSTER, 1987; RÖTHER, 1992), por lo que es obligada su determinación urgente en todos los déficits focales del sistema nervioso central. Dichos déficits focales y enlentecimientos en el EEG con hipoglucemias de 36-72 mgr/dl (2-4 mM/L) son reversibles en el hombre (MEYER, 1958). Durante el coma hipoglucémico, se produce una disminución del consumo de oxígeno. Casi siempre la recuperación clínica es total cuando dura menos de 90 minutos.

En el animal experimental, la hipoglucemia no ocasiona daño neuronal si no se produce aplanamiento del EEG, lo que sucede por debajo de 20 mgrs./dl. Una vez que se ha llegado a éstos niveles, el daño neuronal se correlaciona con el tiempo pasado en hipoglucemia más que con el grado de la misma. Tras 5 minutos de hipoglucemia severa, los potenciales evocados y el EEG se recuperan por completo, pero tras 60 minutos la actividad EEG es escasa y no se evocan potenciales, lo que evidencia un déficit sináptico de la vía somatosensorial que puede ser el correlato neurofisiológico del daño histológico (AGARDH, 1983a). A los 20 minutos de hipoglucemia profunda disminuye el contenido cerebral de ATP y fosfocreatina (LEWIS, 1974). La susceptibilidad de las estructuras cerebrales es muy diferente, encontrándose necrosis a los 20 minutos de una hipoglucemia severa en el hipocampo, y a los 60 en el cerebelo (AUER, 1984).

La hipoglucemia puede producir un estado vegetativo persistente al igual que la hipoxia-isquemia severa, pero a diferencia de ésta se mantiene el flujo sanguíneo (AGARDH, 1983b), la localización de las lesiones neuropatológicas es distinta (KALIMO, 1980a), y el mecanismo por el que probablemente se producen también lo es, dado que se postula un daño por toxinas o aminoácidos excitadores. De hecho,

el contenido de oxígeno del tejido cerebral durante la hipoglucemia profunda parece estar aumentado (KROLICKI, 1980). El neocortex y el hipocampo son dañados tanto por la hipoxia-isquemia como por la hipoglucemia, pero el cerebelo, que es rápidamente lesionado por la hipoxia-isquemia es notablemente resistente a hipoglucemias de más de 30 minutos (AGARDH, 1981a), suficientes en cambio para lesionar el neocortex e hipocampo, y los niveles cerebelosos de ATP disminuyen menos (RATCHESON, 1981), aunque a los 60 minutos también resultan lesionadas las células de Purkinje.

Se ha comprobado que las áreas que se lesionan más fácilmente por la hipoglucemia (N. caudado, neocortex, hipocampo) son las que tienen un menor contenido en glucosa, a pesar que también consumen menos que otras (tronco cerebral, tálamo, hipotálamo, cerebelo) más resistentes a la hipoglucemia (PASCHEN, 1986). Una explicación podría ser que las zonas más dañadas tengan también más lesionado el transporte de glucosa, o que tengan una cinética del transporte de glucosa diferente (ABDUL-RAHMAN, 1980).

Midiendo la síntesis proteica por la incorporación de aminoácidos marcados y su detección por autorradiografía, se ha visto que el neocórtex y el hipocampo (las áreas más sensibles al daño por hipoglucemia, y en las que más se reduce tanto el metabolismo de la glucosa como el contenido de ATP en estas condiciones) así como el caudado putamen, no sintetizan prácticamente proteínas durante el coma hipoglucémico y las neuronas del gyrus dentado y algunas del caudoputamen lateral se necrosan aunque se restaure la glucemia. Esto es lo esperable, pues la síntesis de proteínas es un proceso que requiere energía, y en el cerebro la energía se obtiene por metabolismo de la glucosa. En otras zonas como el tálamo y la médula espinal sintetizan algo, y el cerebelo, tronco e hipotálamo (zonas más resistentes a la hipoglucemia), sintetizan normalmente proteínas (KIESSLING, 1982; KIESSLING, 1986).

También los cambios a nivel celular son distintos a los de la hipoxia-isquemia (KALIMO, 1980b): la hipoglucemia pronunciada produce "neuronas claras" con un halo pálido en la perifería del citoplasma, cambio que es reversible a las tres horas de normalizarse la glucemia, y "neuronas oscuras". Algunas de éstas últimas, a

pesar de la hipercromasia y la tumefacción mitocondrial, se normalizan posteriormente, pero otras que se ven acidófilas con la fuschina ácida, son células necróticas, lo que se comprueba en el microscopio electrónico por la rotura de su membrana nuclear y citoplásmica (AUER, 1985). En las neuronas necróticas no hay aumento del calcio en las mitocondrias (SIMON, 1986c). Las células necróticas se localizan mayoritariamente en las capas superficiales de la corteza, mientras que las células de las capas profundas se normalizan. En el área CA₃ del hipocampo, la zona más dañada es la que se encuentra en la vecindad del ventrículo lateral, y en la corteza sufren mayor lesión las capas más superficiales, por lo que se ha pensado que el daño por hipoglucemia está mediado por una toxina vehiculizada por el LCR (AUER, 1984).

Se postula que es una neurotoxina, pues afecta a las neuronas pero no a la glía y la lesión no aumenta si disminuye el flujo (AUER, 1986), y por tanto los sustratos energéticos: no parece corresponder a lesión por fallo energético. También se piensa en un mecanismo excitotóxico porque la lesión inicial es en las dendritas (AUER, 1985).

Una secuencia hipotética que empezaría cuando el EEG se hace isoelectrico, podría ser: aumento de la excitoxina, entrada de iones siguiendo el gradiente de voltaje, y en particular de calcio, que produciría lipólisis con daño de la membrana y citorrexis. Esta excitoxina podría ser el aspartato por varias razones: aumenta en la hipoglucemia, se sabe que es excitador y neurotóxico, su inhibición disminuye el daño neuronal durante la hipoglucemia (SIMON, 1986a; WIELOCH, 1985) y es la única sustancia que al inyectar glucosa a un ratón hipoglucémico se normaliza antes de que se recupere la función neurológica (GORELL, 1976). Además se han detectado por microdiálisis durante la hipoglucemia, aumentos de 9 a 12 veces del neurotransmisor excitador aspartato en el estriado (BUTCHER, 1987), y también se ha encontrado aumentado en el hipocampo (SANDBERG, 1985). En este mismo sentido de daño mediado por neurotransmisores excitadores, el daño por hipoglucemia en el N. caudado disminuye cuando se interrumpen las aferencias excitadoras por ablación de la corteza o la sustancia nigra, y el bloqueo farmacológico de los receptores excitotóxicos previene la necrosis neuronal (AUER, 1986). Están aumentados en el tejido cerebral, aunque en menor medida otros

aminoácidos como el glutamato, el GABA, y la taurina, pero otros autores no los han encontrado aumentados en el LCR (SIMON, 1986b).

Durante la hipoglucemia el cerebro pierde la capacidad de regular el pH intracelular, y cuando se añade a la hipoglucemia hipocapnia, se produce una alcalosis intracelular (PELLIGRINO, 1981). Cuando el EEG se vuelve isoelectrico se libera potasio al espacio extracelular (ASTRUP, 1976). Además, al igual que en la isquemia, se produce una acumulación de ácido araquidónico (AGARDH, 1980). En hipoglucemia se han encontrado alterados los niveles de ácidos grasos que normalmente se incorporan a las membranas celulares, por lo que así podrían dañarse la membrana plasmática y los procesos sinápticos (STROSZNAJDER, 1984).

A nivel bioquímico, el deterioro del metabolismo energético que produce la hipoglucemia prolongada (disminución del ATP y fosfocreatina con aumento del ADP y AMP), y las alteraciones que se producen en los aminoácidos (aumento del aspartato y reducción del glutamato), son casi por completo revertidas cuando se normalizan las cifras de glucosa (AGARDH, 1978) a excepción de las cifras de ATP y aminoácidos que pueden estar por debajo de lo normal.

En ratas con isquemia cerebral e hipoglucemia se producen más convulsiones, lo que resulta en mayor mortalidad (VOLL, 1988), posiblemente porque la hipoglucemia disminuye la síntesis del aminoácido inhibidor GABA. Infusiones intraperitoneales de ácido láctico también han reducido tanto las convulsiones como la mortalidad ocasionadas por hipoglucemia en la rata (GURUPRAKASH, 1983).

A.5 TEMPERATURA Y METABOLISMO CEREBRAL.

A.5.1 HIPOTERMIA EN EL CEREBRO SANO.

La temperatura corporal es un balance entre las pérdidas (por radiación, convección y evaporación por la piel) y la generación de calor por las reacciones metabólicas. La regulación de la temperatura en animales homoiotermos (de sangre

caliente) como el hombre, se realiza desde el hipotálamo. Cuando la reducción en la temperatura ambiente es moderada, se ajustan las pérdidas de calor (regulación física), pero cuando es más intensa, la regulación incluye generación de calor por los músculos (tiritona y aumento de actividad) y oxidación de la grasa parda. Ello se asocia a una descarga simpaticoadrenal que es una respuesta de estrés. Muchos medicamentos (clorpromacina, anestésicos, etc.) interfieren con la regulación de la temperatura, probablemente en parte porque impiden que se desarrollen los mecanismos adaptativos hipotalámicos.

A nivel molecular, el incremento de la temperatura influye sobre el ritmo en que se produce una reacción aumentándolo, pero en muchas reacciones enzimáticas, si se supera un techo (40-45 °C), la reacción se enlentece al degradarse la enzima responsable de la reacción.

La hipotermia suele actuar en sentido opuesto, enlenteciendo algunas reacciones. Algunas no son influidas por hipotermias moderadas, aunque si es intensa la hipotermia puede inhibir por completo la enzima e interrumpir la reacción. Cuando la hipotermia no influye se debe a que la enzima reguladora tiene una actividad máxima mucho mayor de la que utiliza en condiciones normales y su actividad viene determinada por las demandas de energía o metabolitos más que por la temperatura. Las reacciones que incluyen una enzima catalizadora resultan más afectadas por la temperatura que las que no la precisan.

A nivel celular, el sodio entra en las neuronas por difusión pasiva al despolarizarse éstas, y es sacado por la bomba sodio-potasio ATP dependiente. La hipotermia disminuye la actividad neuronal, y como se producen menos despolarizaciones, entra menos sodio al interior de la célula y también el transporte activo al exterior es menos activo. En hipotermia extrema (1-4 °C), se inhibe por completo la bomba sodio-potasio, por lo que la célula se llena de sodio por difusión pasiva.

En hipotermia se produce una reducción del metabolismo cerebral, por el efecto de la temperatura sobre las reacciones bioquímicas del metabolismo. El efecto de reducir 10 °C sobre el metabolismo ha sido variable: en tejido cerebral "in vitro"

ha reducido el metabolismo a la mitad, en perros "in vivo" de la mitad a la tercera parte según los estudios, y en primates a menos de la tercera parte (MICHENFELDER, 1988). En el hombre probablemente la reducción del metabolismo es a menos de la mitad, pues un cerebro normotérmico no tolera sin daño más de 5 minutos de isquemia global, mientras que en bypass cardiopulmonar a 12-15 °C, se toleran isquemias de hasta una hora.

Existe unanimidad en que el consumo cerebral de oxígeno y glucosa disminuyen con la hipotermia (ASTRUP, 1981). Cuando la hipotermia baja por debajo de 18 grados, el EEG queda prácticamente plano. Esta disminución del consumo de oxígeno, parece seguir una relación lineal entre los 37 y los 22 °C, lo que equivale a una reducción de un 5% por cada grado que baja la temperatura (SIESJÖ, 1978). El consumo de glucosa probablemente sigue una reducción similar.

El flujo sanguíneo cerebral parece disminuir con la hipotermia, pero se mantiene la influencia que tiene habitualmente la pCO_2 en el mismo (aumento de flujo con la hipercapnia y reducción con la hipocapnia) (PROUGH, 1986). La hipotermia lleva a una reducción de la producción de CO_2 , pero como también aumenta su solubilidad en la sangre, el CO_2 total permanece constante. En hipotermia aumenta la presión arterial de oxígeno al disminuir su solubilidad en la sangre.

En la hipotermia, se produce un aumento de pH y bicarbonato. El pH neutro en el que $[H^+] = [OH^-]$ depende de la ionización del agua, que a su vez depende de la temperatura. Por ello, el pH a 25 °C es de 7 y a 37 °C es de 6'86. La diferencia entre el pH medido y el pH neutro, que también aumenta, permanece constante.

Durante una hipotermia de 22 °C, la hipercapnia ocasiona aumentos en el flujo sanguíneo cerebral similares a los que se producen en condiciones de normotermia, y la hipocapnia de 15 mm Hg. redujo dicho flujo a un 15 % del que existía en normotermia y normocapnia. A pesar de este bajo flujo, pudo mantenerse el metabolismo energético tisular, lo que ilustra el papel protector de la hipotermia (SIESJÖ, 1978).

Con hipotermia de 32 °C están disminuidos los depósitos de glucosa y glucógeno, y a 27 y 22 °C, todos los metabolitos de los carbohidratos incluido el ácido láctico, excepto la glucosa-6-fosfato y el citrato. Con respecto a los aminoácidos, se encuentra en diferentes estudios y especies animales una disminución de glutamato (SIESJÖ, 1978).

A.5.2 HIPERTERMIA EN EL CEREBRO SANO.

La hipertermia patológica de diversos orígenes ("golpe de calor", hipertermia maligna por anestésicos) tiene una alta mortalidad precoz que suele ser de causa cerebral, encontrándose en el cerebro edema y petequias (JARDON, 1982), y con frecuencia se asocia también a acidosis láctica. En conejos con "golpe de calor" provocado experimentalmente se encuentra edema en el cerebro así como una disminución de la presión de perfusión cerebral que puede ser debida tanto a la hipertensión intracraneal como a la disminución de la tensión arterial (SHIH, 1984).

La hipertermia produce un aumento del consumo de oxígeno (CMRO₂) de un 5-6% por cada grado centígrado, y un aumento del flujo sanguíneo cerebral en la misma proporción. No modifica los fosfatos orgánicos (ATP, ADP, AMP) ni el cociente entre el lactato y piruvato, y entre los aminoácidos aumenta la concentración de glutamato (CARLSSON, 1976), que es considerado un aminoácido excitotóxico. En el ratón, otros efectos metabólicos de la hipertermia conseguida por calentamiento externo o inducida por anfetaminas son impedir la síntesis de proteínas y disminuir los depósitos de glucógeno (NOWAK, 1988).

Las hipertermias extremas experimentales (43 °C) producen un aumento de la tendencia trombótica, al exponer la sangre al subendotelio protrombótico y reducir la fibrinólisis (ANG, 1994). El daño histológico de la hipertermia de 42 a 48 °C es similar y sigue un curso temporal análogo al del infarto isquémico, excepto que no se acompaña de hemorragia (LYONS, 1986).

Cuando la hipertermia produce aumento de la latencia de los potenciales

evocados somatosensoriales en las ratas, aumenta la mortalidad y el daño histológico, lo que podría estar mediado por las endorfinas, ya que se se previene inyectando naloxona (PANJAWI, 1991).

A.5.3 HIPOTERMIA EN EL INFARTO CEREBRAL.

A continuación revisaremos los efectos que ha tenido la hipotermia en modelos experimentales de isquemia global y focal, y posteriormente los mecanismos que se cree median dichos efectos.

No existen muchos datos sobre hipotermia e isquemia cerebral en el hombre, salvo cuando se reduce en el quirófano la temperatura con fines neuroprotectores en operaciones con riesgo de isquemia cerebral global, por hacerse con el corazón parado, como es la cirugía cardíaca. En parada cardíaca sin hipotermia hay un gran daño cerebral a los cinco minutos, pero con hipotermia se toleran períodos mucho más prolongados. Otro ejemplo de protección de la isquemia global en el humano es que se han recuperado sin daño neurológico inmersiones accidentales en agua fría de hasta 66 minutos con temperatura corporal interna de 19 °C (BOLTE, 1988).

En este mismo sentido y en animales que hibernan, en los que disminuye la temperatura corporal, se producen severas disminuciones del flujo cerebral (7 ml/100grs/min, por debajo del umbral de necrosis celular y con EEG isoelectrico), sin que se produzca daño neuronal.

Estos hechos y los experimentos que ahora mencionaremos han llevado a un consenso sobre el papel protector de la hipotermia en la isquemia cerebral global, aunque ello no resulta tan claro en los modelos regionales, los más relevantes para el hombre pues remedan una patología de gran prevalencia como es el accidente cerebrovascular, y que son los que utilizamos en nuestro experimento.

Como se ha referido, en un modelo de isquemia global transitoria en la rata, la hipotermia cerebral leve (34 °C) tuvo efecto protector reduciendo la lesión

histológica del hipocampo y de los ganglios basales, pero una hipotermia más marcada (24 °C) tuvo un mayor efecto (KULUZ, 1992), desapareciendo la lesión en los ganglios basales (BUSTO, 1987) con temperaturas de 30-31 °C. Una reducción de 2 °C en la temperatura rectal también ha proporcionado protección en el modelo del gerbo (CLIFTON, 1989).

Sin embargo la hipotermia extrema (15 °C), produce mayor daño cerebral y miocárdico que la hipotermia leve o moderada (34 o 30 °C) en modelos de isquemia global (WEINRAUCH, 1992). En modelos de babuino se toleró un paro circulatorio de 90 minutos con una hipotermia de 12 °C, pero con temperaturas más altas (17 °C), o más bajas (7 °C), se produjo daño neurológico.

Otros autores sólo han encontrado protección cuando la duración de la isquemia global era de 8 minutos, pero no si era de 12 (CHOPP, 1991).

Estos estudios han sido realizados en modelos de isquemia cerebral global en la rata o en el conejo, o de isquemia transitoria en la rata, en ocasiones aplicando la hipotermia sólo durante el período de isquemia (BUSTO, 1987).

Están menos estudiados los efectos de la hipotermia en modelos de isquemia focal. Alguno de los primeros trabajos sugería que la hipotermia podía tener un papel dañino (MICHENFELDER, 1977; STEEN, 1979a). Otros trabajos actuales solo detectan protección si la isquemia es global pero no en la focal (MORIKAWA, 1991).

Sin embargo, son más los investigadores que encuentran un efecto beneficioso con reducciones del 77 % del infarto con hipotermias leves de 33 °C (KADER, 1992), y reducciones del 54 % del infarto aunque se retrasara la hipotermia una hora tras la isquemia (MOYER, 1992). Se ha encontrado efecto beneficioso en isquemia focal tanto si se aplica la hipotermia durante la isquemia, como si solo se hace durante el período de reperfusión (XUE, 1991).

Existe controversia sobre el momento de instaurar la hipotermia y sobre la duración que debe tener para ser protectora. Así, en modelos focales, un retraso de

40 minutos en la instauración de la hipotermia la han hecho perder su función beneficiosa (MOYER, 1992). Otros en cambio encuentran efecto beneficioso en isquemia global aunque la aplicación de la hipotermia se retrase hasta el período de reperfusión posterior a la isquemia (XUE, 1991). En los modelos de isquemia global se ha encontrado protección si se instaura la hipotermia a los 15 minutos de la isquemia (KULUZ, 1992) o incluso más tarde (CHOPP, 1991; BUSTO, 1989b).

Han resultado útiles hipotermias de diferentes duraciones, a veces tan cortas como una hora a 24 °C en el estudio de isquemia focal de ONESTI (ONESTI, 1991).

A.5.4 MECANISMOS DE ACCION DE LA HIPOTERMIA.

El efecto de la hipotermia sobre la circulación cerebral es controvertido: en isquemia focal en conejos, la hipotermia de 30 pero no la de 33 °C reduce el flujo cerebral (a pesar de mejorar ambas los potenciales evocados) (LO, 1992). Sin embargo BUSTO no encuentra dicha reducción en un modelo de isquemia global (BUSTO, 1989a).

Respecto al efecto de la temperatura en el flujo sanguíneo cerebral, experimentos "in vitro" con arteriolas aisladas del parénquima cerebral de la rata (OGURA, 1991), han mostrado una vasodilatación arteriolar con la hipotermia y una respuesta bifásica con vasoconstricción inicial y vasodilatación posterior con la hipertermia. Si la temperatura pasa de 45 °C, toda respuesta vascular queda abolida, pero en soluciones sin calcio el diámetro arteriolar no se modifica con temperaturas que varían de 20 a 45 °C. Ello sugiere que los cambios de temperatura actúan sobre la contracción del músculo liso arteriolar dependiente del calcio y que ello puede ser independiente del metabolismo celular.

La hipotermia puede tener un efecto neuroprotector en la isquemia cerebral, en parte al disminuir las demandas metabólicas (WELSH 1990). Pero existen sustancias como el isoflurano o los barbitúricos, que disminuyendo las demandas

metabólicas, no han demostrado consistentemente un papel protector. Por ello se han investigado y se han postulado muchos otros mecanismos de acción posibles.

La hipotermia favorece la vuelta al metabolismo normal de la glucosa (GINSBERG, 1989), facilitando la recuperación metabólica, tal vez por mantener mejor los depósitos de AMP (SUTTON, 1991) del que se regenera el ATP. Pero la protección parece no depender sólo del mantenimiento de los fosfatos de alta energía como el ATP y la fosfocreatina ni de evitar la acumulación del ácido láctico, pues ambas cosas suceden tanto en la normotermia como en la hipotermia leve (34 °C), y sin embargo solo la última confiere protección histológica (BUSTO, 1987).

Su acción beneficiosa también puede deberse a una disminución del daño por radicales libres (BAIPING, 1994) y a que atenúa el aumento de aminoácidos excitadores como el glutamato (BUSTO, 1989a) o la glicina (BAKER, 1991b), que se liberan durante la isquemia, activan el complejo N-metil-D-aspartato y facilitan la entrada de calcio en las neuronas. También disminuye la liberación de dopamina.

Otros mecanismos que se han propuesto son que la hipotermia minimiza la acidosis intracelular y que impide el aumento del potasio extracelular ocasionado por el daño de membrana que precede a la muerte neuronal.

La hipotermia no impide la acumulación tisular de ácidos grasos libres, pero sí disminuye la producción de leucotrieno-B-4 que está ligado a la producción de edema. Tampoco impide la hipotermia la acumulación de ácido láctico cerebral en un modelo de isquemia cerebral global por parada cardíaca de 10 minutos en el perro, aunque sí minimiza el daño neurológico y la mortalidad, por lo que el mecanismo protector no debe consistir solo en disminuir el ácido láctico (NATALE, 1989). En otro modelo experimental se han hallado similares resultados (BUSTO, 1987).

La hipotermia previene la ruptura de la barrera hematoencefálica que en cambio está especialmente alterada en la hipertermia (DIETRICH, 1990a), en la que se produce extravasación de proteínas. Por último la hipotermia estabiliza la fluidez de las membranas lipoproteicas.

En un modelo de isquemia por aumento de la presión intracraneal en el perro, la recuperación de los potenciales evocados somatosensoriales por la hipotermia se ha asociado a una disminución de la presión intracraneal, por lo que este podría ser otro de sus mecanismos protectores de la hipotermia (BALDWIN, 1991).

Se ha estudiado si la protección que ejerce la hipotermia podría estar mediada por la proteína HSP-72 (proteína del "golpe de calor" de 72 Kilodaltons) que se produce en respuesta a varios estímulos nocivos incluida la isquemia. En ratas sometidas a isquemia cerebral global en condiciones de hipotermia, disminuye tanto la lesión neuronal como la expresión de la proteína HSP-72 (CHOPP, 1992), por lo que el efecto protector de la hipotermia no debe ser mediado por la HSP-72. Este efecto de inhibición de la HSP-72 también se ha observado en cultivos celulares (LANCKS, 1990). La proteína p53 aparece en las zonas de necrosis isquémica donde no aparece la HSP-72, por lo que podría ser inhibida por ésta.

La ubiquitina es otra proteína de golpe de calor que aparece tras lesiones celulares de varios tipos. Aumenta en las áreas de isquemia aunque en menor medida que la HSP-72 y se une a las proteínas dañadas que son digeridas por proteasas, por lo que probablemente tiene importancia reparadora. La hipotermia leve, al tiempo que protege a las neuronas del hipocampo, restablece la síntesis de ubiquitina tras la isquemia, lo que es otro motivo para pensar que la ubiquitina puede ser uno de los mecanismos protectores de la hipotermia (YAMASHITA, 1991).

También la hipotermia impide a la vez el daño a las neuronas hipocámpicas y la disminución de la enzima proteín-kinasa tipo II dependiente del calcio/calmodulina, que tiene varias funciones en la síntesis y liberación de neurotransmisores, en la conductancia iónica y en el citoesqueleto, por lo que puede mediar el efecto beneficioso de la hipotermia (CHURN, 1990).

Como hemos mostrado la mayoría de los experimentos están hechos en modelos de isquemia global. Los experimentos de isquemia focal han utilizado condiciones experimentales diferentes en cada experimento. Por ejemplo, algunos estudios utilizando el modelo focal, solo han permitido sobrevivir seis horas al

animal (BAKER, 1991a), cuando se sabe que el infarto cerebral evoluciona durante mucho más tiempo. Por ello, a nuestro entender, no está suficientemente estudiado en el modelo de isquemia cerebral focal en la rata que es a la vez el más reproducible y similar (exceptuando el primate) al accidente cerebrovascular isquémico humano.

A.5.5 HIPERTERMIA EN EL INFARTO CEREBRAL.

Existe hipertermia en el 44 % de los ACV, correlacionándose con su severidad (HINDFELDT, 1976). En la mayoría de las ocasiones se debe a un foco infeccioso pulmonar, urinario o a una trombosis venosa profunda, pero en otras el responsable es el propio infarto cerebral, especialmente cuando es extenso, afecta el hipotálamo o se trata de una hemorragia con vertido ventricular. Durante la fase aguda, aumentos tan pequeños como 1 °C pueden empeorar el pronóstico, que también es peor cuanto más dura la hipertermia.

En estudios animales se ha observado en general un aumento del área de infarto cuando se provoca una hipertermia aunque sea moderada, tanto cuando se aplica en el momento de producir el infarto como poco después, y tanto en modelos de isquemia focal (CHEN, 1991) como en modelos de isquemia global (DIETRICH, 1990b). También aumenta la mortalidad. Se ha propuesto que la hipertermia produce alteración en el metabolismo tisular del oxígeno con hipoxia y acidosis tisular, interferencia con el metabolismo del ATP (CHOPP, 1988a) y liberación de aminoácidos excitotóxicos como el glutamato (CARLSSON, 1976), o bien rotura de la barrera hematoencefálica, con producción de edema y llegada de los neurotransmisores excitotóxicos al espacio extracelular (DIETRICH, 1990a). En cambio la hipotermia es capaz de inhibir casi completamente la liberación de glutamato y en un 60 % la de dopamina (BUSTO, 1989a). La hipertermia, al revés que la hipotermia, induce la expresión de la proteína del "golpe de calor" HSP 72.

Se puede reducir la temperatura hasta los 20 °C, temperatura a la que puede aparecer fibrilación ventricular y fallo circulatorio, pero si esto se evita con un soporte circulatorio mecánico, el cerebro puede tolerar temperaturas aún más bajas.

En la hipertermia, el margen es mucho más estrecho: a los 40 °C aparecen náuseas, desorientación y delirium, y a 43 °C o más convulsiones, coma y muerte por golpe de calor. Probablemente se produce daño neuronal directo por inactivación de las enzimas proteicas.

La hipertermia produce de forma reactiva hiperventilación para aumentar las pérdidas de calor por evaporación, lo que origina una hipocapnia con la consiguiente vasoconstricción cerebral, por lo que es difícil distinguir los efectos de la hipertermia en sí, salvo que se mantenga constante la $p\text{CO}_2$, lo que no se ha hecho en muchos estudios.

In vitro, la captación de oxígeno por el tejido cerebral aumenta inicialmente de forma progresiva desde los 40 a los 43 °C, pero por encima de los 40 °C va declinando con el paso del tiempo, y por encima de los 45 °C desde un principio la captación de oxígeno está disminuida. Si se mantiene una temperatura suficientemente alta, se produce una depresión irreversible del ritmo metabólico. El aumento de amoniaco se correlaciona bien in vitro con esta depresión debida al daño celular.

También en animales de experimentación, hay un aumento de consumo de oxígeno entre los 40 y 42 °C, pero a 43 °C ya casi no aumenta más. Esto representa un aumento del 5% por grado, por lo que la hipertemia incrementa el consumo de oxígeno en la misma proporción que la hipotermia lo disminuye. A pesar de la hipocapnia acompañante, se mantiene el flujo sanguíneo cerebral, lo que sugiere que la influencia vasodilatadora de la hipertermia contrarresta la influencia vasoconstrictora de la hipocapnia. Manteniendo la $p\text{CO}_2$ constante, se produce un aumento del flujo cerebral proporcional al de consumo de oxígeno.

En la hipertermia está aumentado el contenido celular de glucosa, glucosa-6-fosfato, y fructosa-6-fosfato, no se sabe si por una disminución en el metabolismo o un aumento del transporte. El piruvato y otros metabolitos del ácido cítrico mantienen concentraciones normales y entre los aminoácidos el glutamato está aumentado. Sin embargo no se encuentra el aumento de amoniaco detectado "in vitro" (SIESJÖ, 1978).

Como vimos en la parte del trabajo dedicada a evaluar los cambios de glucemia, la hiperglucemia en la isquemia transitoria experimental se asocia a hipertermia, que no es la causa del mal pronóstico de la hiperglucemia, sino la consecuencia de una lesión cerebral más grave con posible alteración de los centros termoreguladores cerebrales o liberación de sustancias que aumentan la temperatura. Ello se infiere de que al evitar la hipertermia no se impide el aumento de mortalidad de las ratas hiperglucémicas (UCHINO, 1994).

B. OBJETIVOS.

B. OBJETIVOS.

El presente trabajo está compuesto por dos estudios independientes, pero que se han agrupado bajo un mismo título al utilizar el mismo modelo experimental, la misma metodología y referirse ambos a variables biológicas que afectan al metabolismo cerebral.

B.1 OBJETIVOS EN EL EXPERIMENTO SOBRE GLUCEMIA E INFARTO CEREBRAL.

El objetivo del trabajo es estudiar el modo en que la glucemia sanguínea influye en la extensión del infarto cerebral.

A) Conocer cómo modifican los niveles de glucemia conseguidos en animales de experimentación y en ambiente de laboratorio el volumen de los infartos cerebrales.

B) Determinar si el momento en el que se establece la hipoglucemia (antes o después de producido el infarto cerebral) influye en el volumen del infarto cerebral.

C) Valorar el efecto que sobre el volumen de infarto cerebral tienen cuatro condiciones diferentes, aplicando cada una a un grupo distinto de animales:
grupo 1: Hiperglucemia posterior al infarto; grupo 2: Normoglucemia posterior al infarto; grupo 3: Hipoglucemia posterior al infarto y grupo 4: Hipoglucemia previa al infarto.

D) Conocer si otras variables a controlar en el estudio influían en los efectos que se pretendían investigar.

B.2 OBJETIVOS EN EL EXPERIMENTO SOBRE TEMPERATURA E INFARTO CEREBRAL.

En esta segunda parte del trabajo pretemos evaluar si la disminución de las temperaturas corporal y cerebral influyen en la extensión del infarto cerebral en el mismo modelo experimental de isquemia cerebral focal utilizado anteriormente.

Por lo tanto los objetivos son similares a los del estudio de la glucemia, sustituyendo ésta variable por la temperatura, y teniendo en cuenta que la única variación de la temperatura que se estudió fue la hipotermia respecto de la normotermia, y que a todos se aplicó la hipo o normotermia en el mismo momento: desde el inicio del experimento.

Por ello se establecieron dos grupos: **grupo 5 de Normotermia y grupo 6 de Hipotermia.**

C. MATERIAL Y METODOS.

C. MATERIAL Y METODOS.

C.1 ANIMAL EXPERIMENTAL Y CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES DURANTE EL EXPERIMENTO.

Todos los animales experimentales fueron ratas Wistar, hembras de 250 a 350 grs. nacidas y criadas en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital "General Yagüe" de Burgos. Antes de la cirugía, todas ellas tuvieron la misma alimentación con pienso comercial para ratas y agua a las que tenían acceso libre, estuvieron sometidas a la misma temperatura ambiente del laboratorio durante y después de la cirugía, y a los mismos ritmos de exposición a la luz.

La rata que se iba a operar era mantenida durante unos cinco segundos en una campana de cristal con un algodón empapado en Isoflorano como preanestésico para facilitar la inyección intramuscular del anestésico que se realizaba a continuación en la pata delantera. Se dejaba descansar entonces a la rata hasta que quedaba profundamente anestesiada, para proceder posteriormente a la cirugía como indicaremos.

Para la anestesia se utilizó una mezcla de diazepám, atropina y ketamina, pues a las dosis utilizadas, ninguno de estos compuestos ha mostrado papel protector en el infarto cerebral (JENSON, 1988). Se ponían inicialmente 2'5 ml. de una mezcla de 10 ml. que contenía 5 mgrs. de Ketamina, 2 mgrs. de Diacepam y 0'1 mgrs. de Atropina, lo que constituyen 12'5 mgrs. de Ketamina, 5 mgrs. de Diacepam y 0'25 mgrs. de Atropina. Se repetía la mitad de la dosis a demanda si era preciso durante la cirugía. Se ha calculado la dosis por 100 grs. de peso corporal de rata de los tres principios activos que recibió cada animal y se ha comprobado que las diferencias entre las dosis medias utilizadas en los diferentes grupos de tratamiento tanto en el trabajo de la glucemia como en el de la temperatura, no eran

estadísticamente significativas. Por este motivo, no creemos que la anestesia, por otra parte inevitable, haya influido en los resultados de los experimentos.

Se monitorizó durante la cirugía la presión en la arteria femoral mediante un cateter relleno de suero salino heparinizado y conectado a un transductor de bajo volumen (0'25 ml.) para medición de presión arterial en animales pequeños, TRA 021 de la marca Leticia. El transductor enviaba su señal al amplificador PR 206 del registrador oscilográfico 4006 (un polígrafo de cuatro canales) de la misma marca, que producía un registro en papel térmico. Tras la cirugía y ceder el efecto del anestésico que pudiera modificarla, se dejó de medir la presión arterial.

Se descartaba el animal si disminuía la presión arterial media por debajo de 50 mmHg, pues como se ha referido en el apartado de Introducción, es por debajo de dicha presión cuando puede disminuir la perfusión cerebral.

La reducción de presión arterial que se necesita para producir silencio electrofisiológico y fallo de bomba iónica en modelos experimentales es menor si se añade hipoxia (ASTRUP, 1981), por lo que se piensa que la hipoxia puede agravar los efectos de la isquemia. Por este motivo se controlaron los gases arteriales al final de la cirugía en el experimento en el que se modificaba la glucemia, con intención de descartar los animales con una presión parcial de oxígeno menor de 80 mm. de Hg., lo que no sucedió en ningún caso. Tampoco se encontraron aumentos significativos de la presión parcial de anhídrido carbónico.

En el experimento de la glucemia, las diferencias entre la hemoglobina inicial y final que tenía cada grupo no difirieron significativamente. Por este motivo, en la segunda parte del trabajo (infarto cerebral y temperatura), no se creyó necesario hacer mediciones de gases arteriales y hemoglobina, al comprobar que las condiciones experimentales no los modificaban y por considerar que las extracciones de sangre en un animal de tan bajo volumen circulante como la rata introducen variables que pueden influir en el experimento.

C.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.

Como se ha referido en el apartado de OBJETIVOS, en el experimento sobre la glucemia y el infarto cerebral se hicieron tres grupos en los que la modificación de la glucemia se realizaba a las dos horas de la oclusión de la arteria cerebral media: **grupo 1: Hiperglucemia** (por encima de 200 mgr/dl) tras la cirugía con catorce animales; **grupo 2: Normoglucemia** o hiperglucemia moderada (70-200 mg/dl) tras la cirugía con siete animales; **grupo 3: hipoglucemia posterior a la oclusión vascular** (dos horas, y con valores menores de 70 mgr/dl) con ocho animales. En un cuarto grupo, se provocaba la hipoglucemia justo antes de comenzar la cirugía, constituyendo el **grupo 4: Hipoglucemia previa a la oclusión vascular** con diez animales.

Además de la glucemia basal, previa a la cirugía, se hacían otras cuatro determinaciones de glucemia durante las 24 horas del experimento. Como los intervalos de tiempo entre los que se efectuaba la medición no eran iguales entre sí, el valor que se utilizó como variable independiente principal fue el de la glucemia media ponderada en el tiempo (**GLUCEMP**) calculada multiplicando cada glucemia por las horas que seguían hasta la siguiente extracción y dividiendo por las 24 horas que duraba el experimento. De la misma manera se calculaba la temperatura media cerebral ponderada en el tiempo (**TEMPPC**) en el experimento en el que la variable independiente principal era la temperatura, aunque en éste caso, el tener un registro continuo de temperatura cerebral permitía ponderar diez determinaciones.

Se decidió modificar la glucemia en los tres primeros grupos dos horas después del inicio del infarto cerebral pensando que en clínica humana, tras un ictus, no podrían realizarse modificaciones de la glucemia antes de éste tiempo. Pero para estudiar si el momento de instauración de la hipoglucemia influía, se hizo un cuarto grupo en el que la hipoglucemia se provocaba antes del infarto.

El grupo de normoglucemia tiene valores que se considerarían de hiperglucemia en la especie humana, pero en la rata se asume una concentración plasmática normal de glucosa de 9 moles/L, lo que equivale a 162 mg/dl. (SIESJÖ, 1978).

Junto con la primera y última determinaciones de glucosa, se medía también la hemoglobina en grs/dl, determinándose así las variables hemoglobina inicial, hemoglobina final y la diferencia entre ambas. Tras la cirugía se medía en sangre arterial las presiones parciales de oxígeno y anhídrido carbónico.

C.3 METODOS PARA PROVOCAR Y MEDIR LA HIPOGLUCEMIA, HIPERGLUCEMIA, LA HIPOTERMIA Y LA NORMOTERMIA.

En la literatura se ha administrado insulina por varias vías para conseguir hipoglucemia. Por vía subcutánea, inyectando 1 unidad de insulina regular por cada 100 grs. de peso, la acción dura 6 horas, viéndose la máxima reducción de la glucemia (en un 35 % de los controles) a las 2-3 horas, por lo que la glucemia no se mantiene estable (ALBRECHT, 1979). Para conseguir hipoglucemias severas capaces de provocar daño cerebral, (2'1 a 24 mg/dl) se ha utilizado insulina regular intraperitoneal en dosis de 0'9 a 2'1 unidades por 100 grs. (AUER, 1984), y en otras ocasiones 4 unidades por 100 grs. (ASTRUP, 1976).

Nosotros utilizamos en los grupos 3 y 4 de hipoglucemia 5 unidades de insulina regular disuelta en 30 ml. de suero glucosado al 5% en infusión intravenosa continua mediante la bomba de infusión Perfusor Secura FT de la marca B. Braun, para conseguir la hipoglucemia de forma más rápida y estable. Ello se hacía a las dos horas de la cirugía en el grupo 3 e inmediatamente antes de la misma en el grupo 4 manteniéndose la infusión durante 24 horas hasta el sacrificio del animal. Al ser la respuesta de la glucemia variable entre los animales, era necesario regular el flujo de la boma dependiendo de las determinaciones de la glucemia que se realizaban periódicamente. Por la cirugía y la situación de estrés, las ratas desarrollaban hiperglucemia, por lo que para mantener una glucemia normal el grupo 2 de normoglucemia también necesitó insulina por la misma vía.

Las determinaciones de glucemia se realizaron tras extracción de 0'1 ml. de sangre y su posterior centrifugado, y medición en un aparato Beckman Glucose Analyzer-2. Debido a estar todavía más implantadas, se utilizaron para la glucemia las unidades tradicionales de medida de mgrs/100 ml que pueden convertirse

fácilmente a las unidades internacionales SI teniendo en cuenta que 1 mmol/L son 18 mgrs/100 ml. Por lo tanto, $\text{mg/dl} \times 0,05551 = \text{mmol/L}$.

Otra variable que debe ser controlada es la temperatura. Tras la cirugía y la anestesia, las ratas sufren una reducción de su temperatura corporal, por lo que para mantener la temperatura es necesario un ligero calentamiento externo que en nuestro caso se hizo mediante una manta eléctrica. En el experimento de la glucemia se consideró suficiente la medición de la temperatura rectal de forma intermitente, manteniéndose la temperatura rectal en los rangos de $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Al estar todos los animales sometidos a la misma cirugía y temperatura ambiente, se asumió que existirían temperaturas cerebrales homogéneas entre los diferentes grupos.

En el experimento en el que la temperatura cerebral era la variable independiente, se midió además de la temperatura rectal intermitentemente, la temperatura cerebral de forma continua por una sonda para temperatura de la casa Yellow Springs conectada al amplificador TEMP 806 del polígrafo Letica antes citado. Dicha sonda era fijada bajo el músculo temporal y situada adyacente a la craneotomía, donde se ha comprobado que la temperatura medida es un fiel reflejo de la temperatura cerebral. En el grupo de hipotermia el objetivo era mantener la temperatura cerebral aproximadamente 10°C por debajo del grupo de normotermia. La temperatura cerebral, probablemente por la isquemia y la pérdida de calor por la craneotomía es inferior a la rectal (BUSTO, 1987). Como veremos, por este motivo la temperatura cerebral del grupo de normotermia fue unos dos grados menor que la rectal (que fue aproximadamente de 37°C).

Para evitar ésta bajada espontánea de temperatura, el grupo normotérmico se calentó suavemente con manta eléctrica como hemos dicho, mientras en el grupo de hipotermia se enfriaba todo el cuerpo del animal, por medio de bolsas heladas, de manera que la sangre que llegara al cerebro tuviera una menor temperatura. Además se enfriaba de manera especial el cerebro por medio de un tubo de plástico enrollado alrededor de la cabeza, por el que se hacía circular agua helada a mayor o menor velocidad según la temperatura deseada. Así se conseguía una temperatura cerebral menor que la rectal, evitando las complicaciones cardiorespiratorias que se asocian a la hipotermia sistémica profunda.

C.4 CIRUGIA.

Como se ha referido en la introducción, se utilizó el modelo de isquemia focal de TAMURA (TAMURA, 1981a) de oclusión microquirúrgica de la arteria cerebral media que se realizó íntegramente bajo un microscopio WILD M 650 a una amplificación de 40 aumentos.

Explicamos brevemente los pasos que seguimos: tras anestesiarse al animal, hacer las mediciones basales (glucemia, temperatura) y situarlo en las condiciones experimentales propias de su grupo, se cateterizó una arteria femoral para medición de la presión durante la cirugía como se ha explicado más arriba y en el caso del experimento de la glucemia se cateterizó también una vena femoral para infundir el suero glucosado con o sin insulina según el grupo experimental. En ambos casos utilizamos un catéter de plástico de calibre fino (Abbocath 26 G). Tras rasurar la zona, se hizo una incisión en la piel equidistante entre el canto externo ocular y el conducto auditivo externo (**Figura 2A**), y se retiró el músculo temporal. Se cortó un trozo de apófisis cigomática, accediendo al cráneo, donde se realizó una pequeña craneotomía con una fresa dental. Se abrió la duramadre con una aguja, dejando al descubierto la superficie cerebral y la arteria cerebral media (**Figura 2B**). Se coaguló la arteria mediante pinzas de coagulador bipolar (Elektrotom MC-20 de la casa Martin), ocluyéndose en dos puntos: 2 mm. proximal a la cintilla óptica (**Figura 3A**) para incluir a las arterias lentículoestriadas y distal a la intersección de la arteria cerebral media con la vena cerebral inferior, (**Figura 3B**) cortándose el vaso para evitar la recanalización. De ésta manera, como se refirió anteriormente, se produce infarto en el 100 % de los casos, y éste es homogéneo en cuanto a extensión y localización, incluyendo la zona infartada no solo cortex cerebral sino además ganglios basales (pues quedan ocluidas también las ramas lentículoestriadas de la arteria cerebral media).

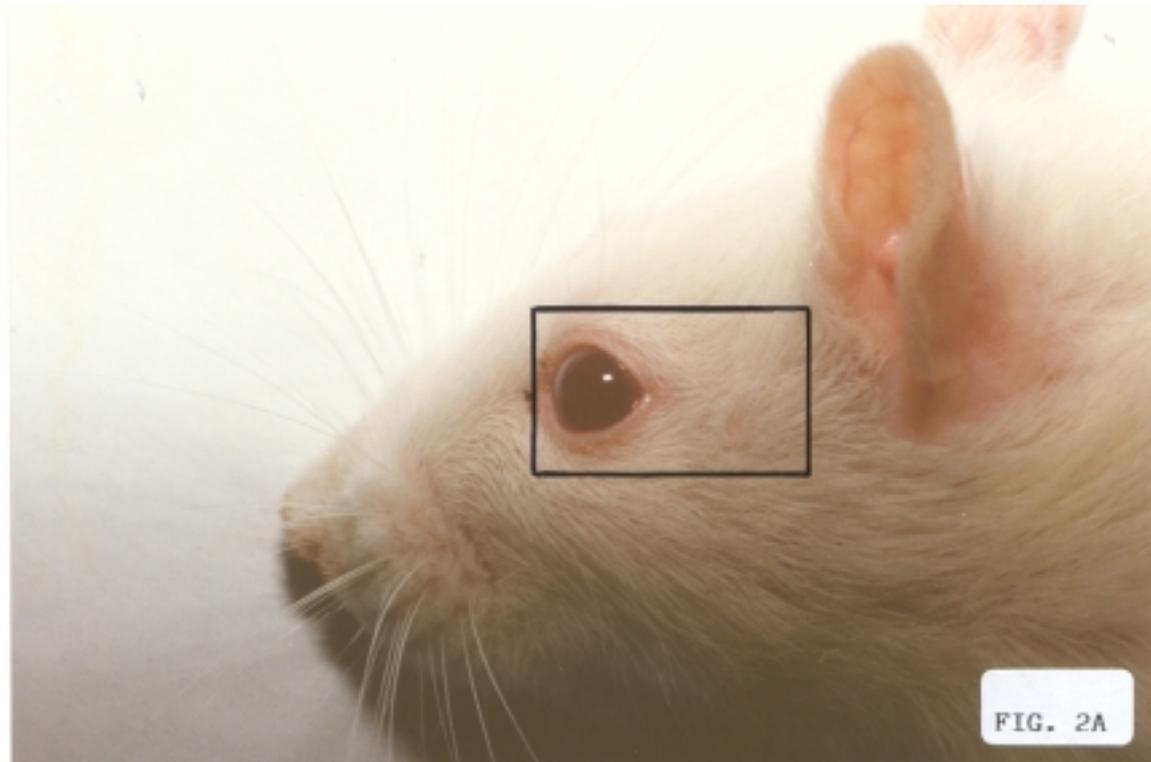


Figura 2A. Lugar donde se realiza la incisión. El campo quirúrgico está recuadrado.
Figura 2B. Campo quirúrgico ampliado bajo microscopio. Arteria cerebral media (ACM) coagulada, suturada y cortada (flecha).



FIG. 3A

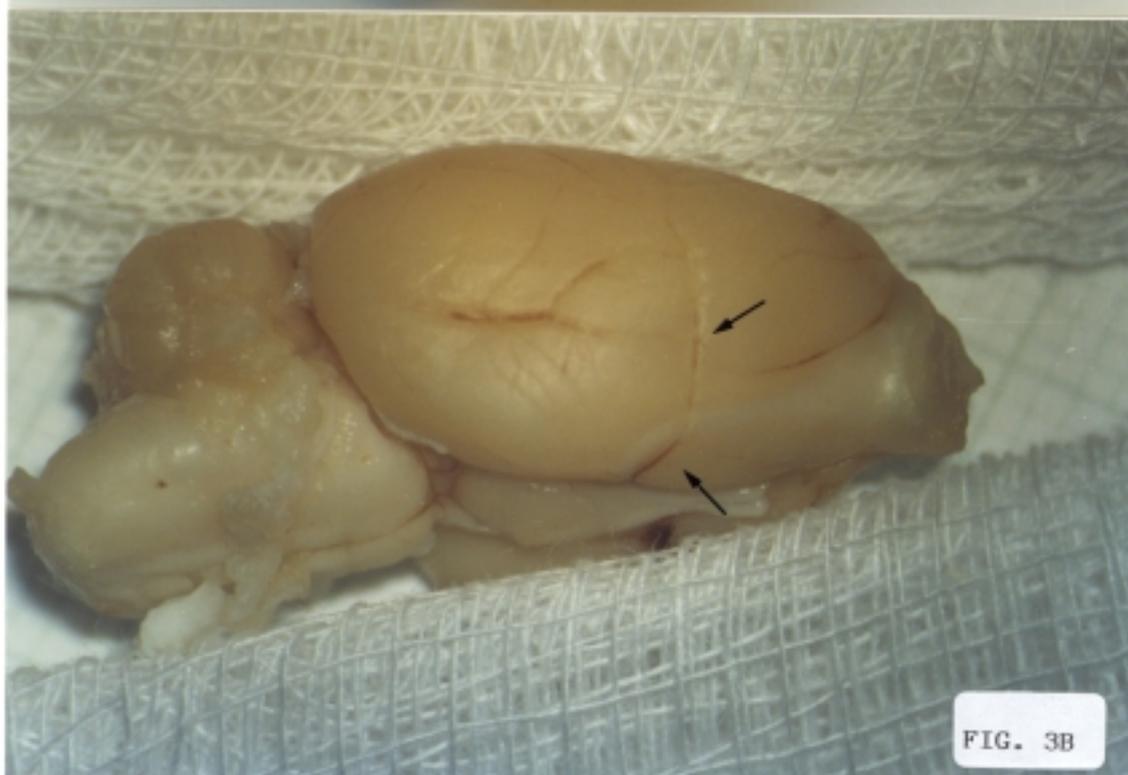


FIG. 3B

Figura 3A. Superficie basal del cerebro, con lugar de oclusión proximal de la ACM (flecha). Tracto olfatorio (cabeza de flecha). **Figura 3B.** Superficie dorsal del cerebro con lugares de oclusión proximal y distal de la ACM (flechas).

En todos los casos la oclusión se realizó en la arteria cerebral media izquierda. Posteriormente se cerró el músculo temporal por planos, y posteriormente la piel. En el experimento en el que se modificaba la temperatura cerebral se dejaba una sonda para medir temperatura fijada con seda quirúrgica al músculo temporal. Tras comprobar que la tensión arterial era normal (mayor de 50 mm de Hg. de tensión arterial media), se dejaba de medir tras la cirugía y se dejaba descansar al animal en un cepo para ratas (LE 5022 de la casa Letica) las siguientes 24 horas hasta su sacrificio, sin acceso al alimento para evitar que se pudiera modificar la glucemia.

C.5 SACRIFICIO Y EXTRACCION CEREBRAL.

Las ratas fueron profundamente anestesiadas con el mismo anestésico utilizado para la cirugía, pero a una dosis mayor (20 mgrs de valium, 50 mgrs de Ketamina y 1 mgr de Atropina) e inmediatamente se realizó toracotomía con punción cardiaca del ventrículo izquierdo, clampaje de la cava inferior a su llegada a la aurícula derecha, e incisión de la misma para permitir la circulación del fijador infundido. A continuación se inyectó en el ventrículo izquierdo suero heparinizado en una pequeña cantidad para evitar el artefacto conocido como cambio celular hidrópico (BRIERLY, 1973), seguido de la perfusión "in vivo" de 50 ml de formol al 10 % a baja presión mientras el corazón permanecía latiendo y por tanto propulsando el fijador. Posteriormente se decapitaba el animal y se extraía el cerebro teniendo gran cuidado en no tocar la corteza cerebral para evitar el artefacto llamado de las "neuronas oscuras" (CAMMERMEYER, 1961). El cerebro se dejaba en formol al 4 % al menos una semana para su perfecta fijación.

C.6 METODOS HISTOLOGICOS.

Previamente a comenzar este ensayo se realizaron de forma piloto tinciones enzimáticas en varios cerebros con cloruro de trifeniltetrazolium (BEDERSON, 1986b; LUNDY, 1986), que al teñir solo las células con su contenido enzimático conservado, permite delimitar bien las áreas de infarto, que quedan pálidas al carecer de enzimas. Comprobamos que ésta zona pálida se corresponde bien con la zona de alteración histológica de la hematoxilina-eosina, como han visto

otros autores. Sin embargo, para no destruir las enzimas, es necesario cortar el cerebro sin fijar, por lo que es muy friable y si se realizan cortes finos como se hizo en este caso para que el cálculo del volumen fuera muy exacto, se producen artefactos de corte. Por ello hemos preferido la histología convencional, en tinciones de hematoxilina-eosina con los criterios de necrosis celular habituales, como hacen la mayoría de los autores. Es necesario evitar el "cambio celular hidrópico" que se observa cuando se producen retrasos de fijación, y para ello utilizamos una fijación intravascular "in vivo".

En cortes sagitales, con una lupa de pocos aumentos, pueden delimitarse algunas estructuras cerebrales, y más en concreto el caudoputamen, que como veremos, medíamos por separado (**Figura 4**). La zona de infarto se veía macroscópicamente como una zona más pálida, que en general se definía bien con la lupa (**Figuras 5 A-H**).

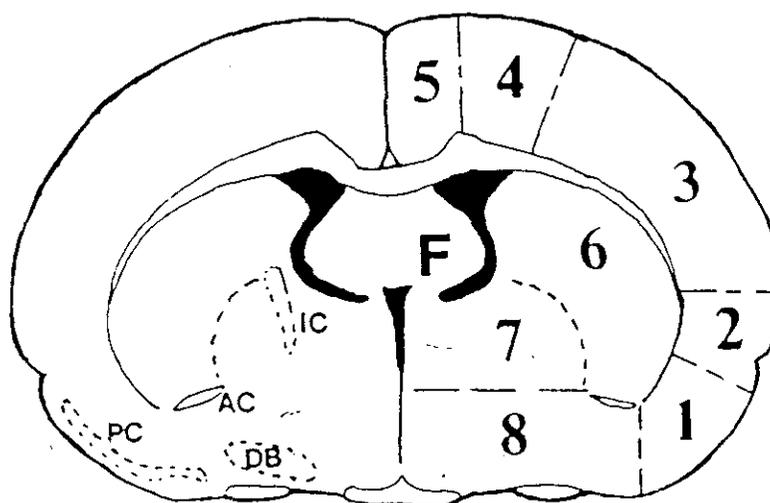
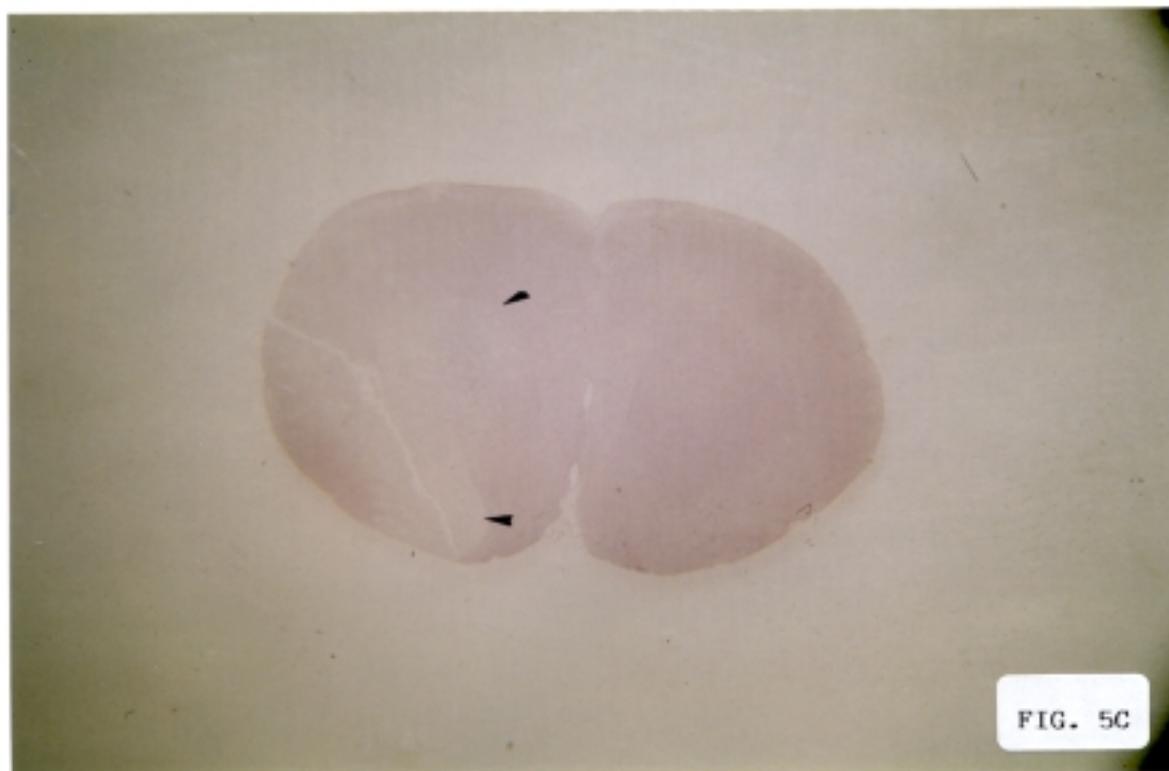
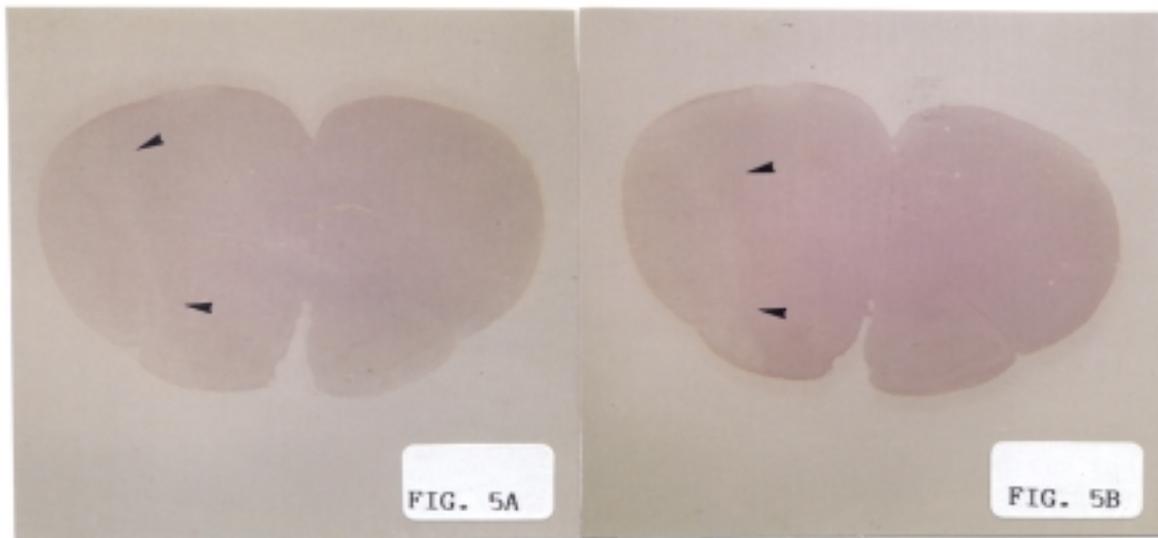
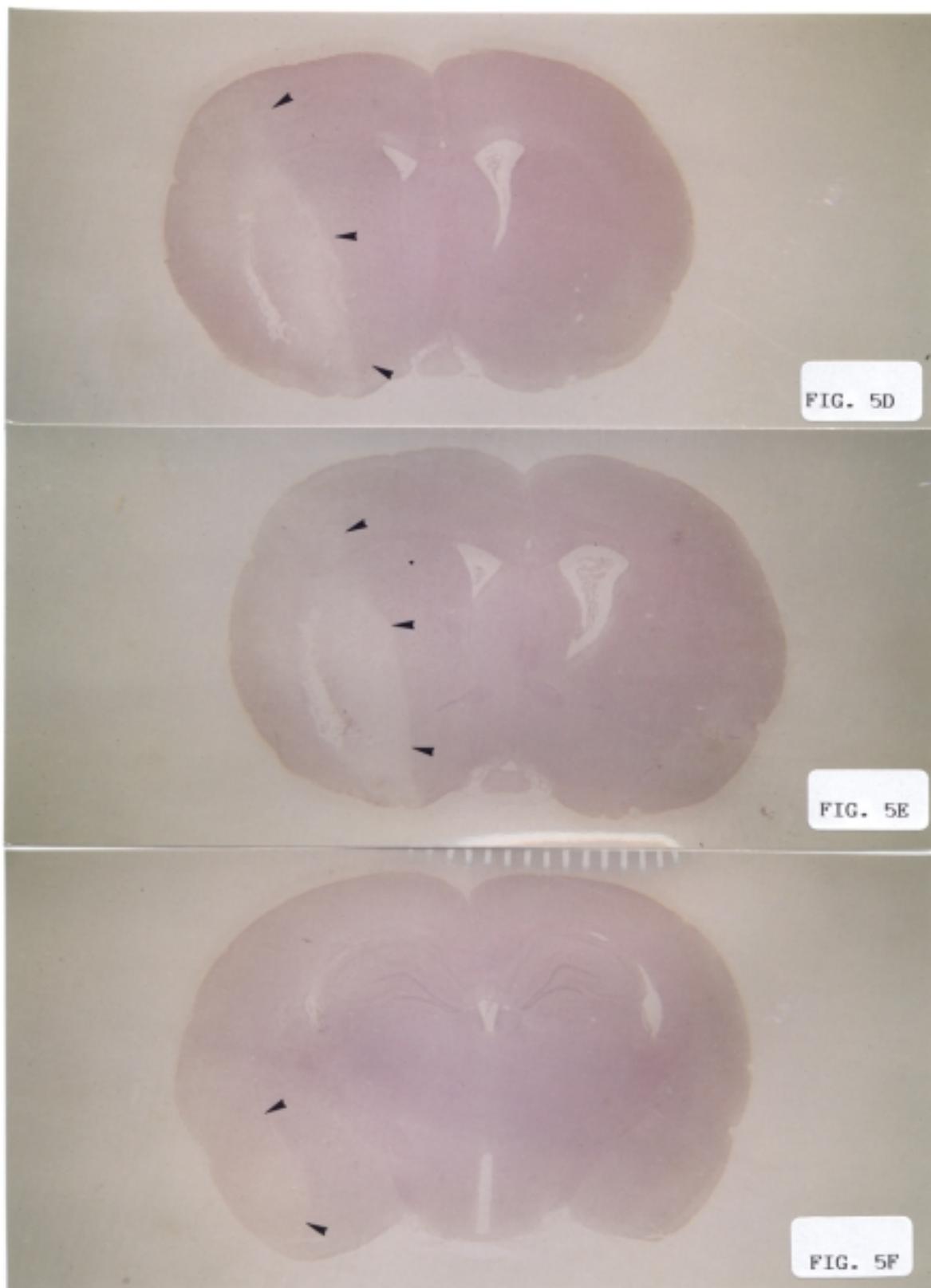
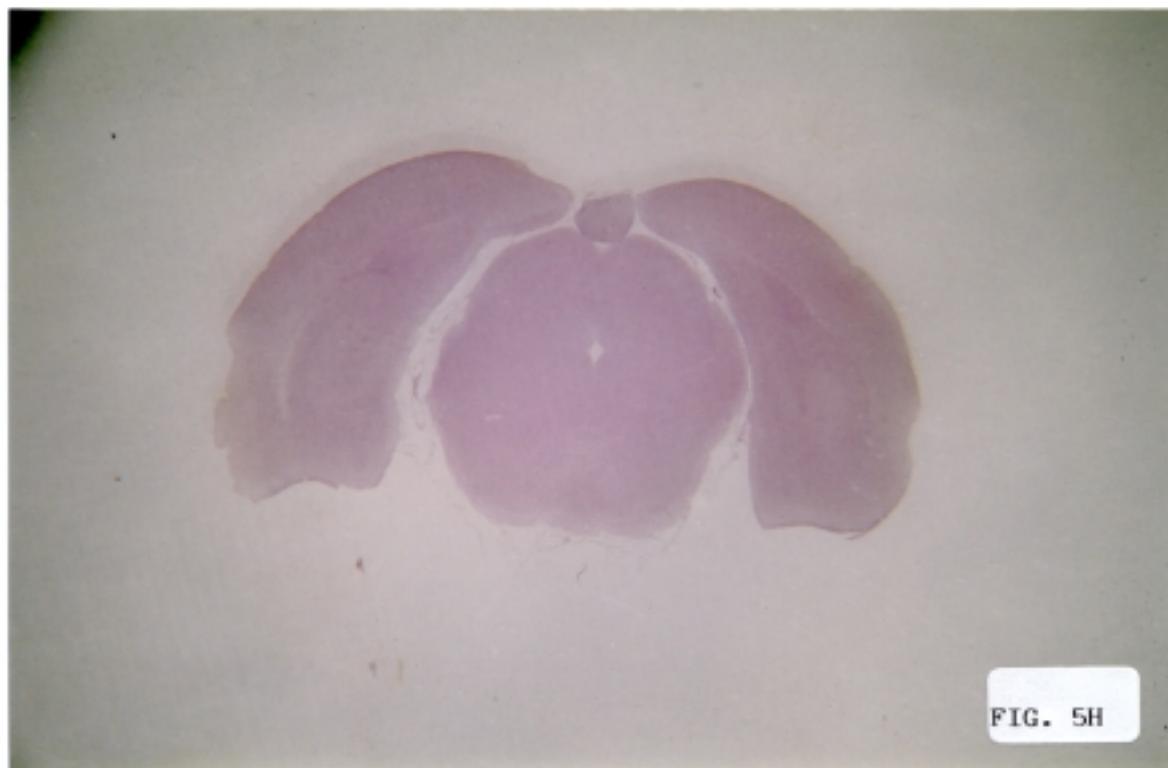
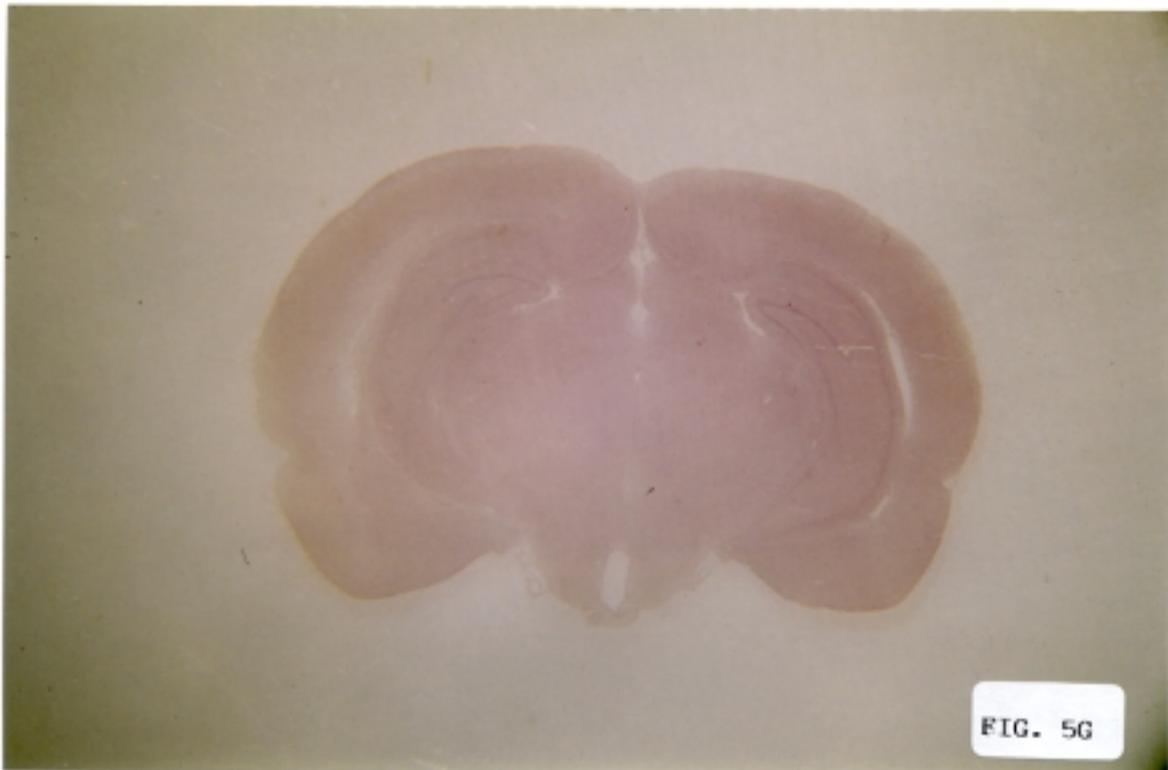


Figura 4. Areas anatómicas identificadas en un corte sagital del cerebro de rata a nivel de la comisura anterior. Area 1: córtex piriforme. Area 2: córtex insular. Area 3: córtex parietal. Area 4: áreas corticales de la pata trasera y delantera. Area 5: córtex frontal y cingular. Area 6: caudoputamen. Area 7: globo pálido. Area 8: área preóptica (medial y lateral). IC: cápsula interna. F: fórnix. DB: banda diagonal. PC: córtex piriforme. AC: comisura anterior (tomado de: GARCIA, 1993).

Figura 5 (A-H). Cortes sagitales de cerebro de rata en sentido anteroposterior teñidos con hematoxilina-eosina, separados por 1 mm. El área de infarto es más pálida y está en el hemisferio izquierdo (lado izquierdo de las figuras), con el borde medial señalado con cabezas de flecha.







Cuando había dudas se recurría a los cambios isquémicos neuronales convencionales en microscopía óptica que consisten en neuronas retraídas y anguladas, eosinofilia citoplásmica y picnósis nuclear (LITTLE, 1974). Estos cambios de microscopía óptica corresponden en microscopía electrónica (que no utilizamos en nuestro experimento) a un aumento de densidad de la matriz citoplásmica y nuclear, fragmentación de los lisosomas a las 12 y de las membranas a las 24 horas. Ultraestructuralmente las mitocondrias sufren balonización.

C.7 MEDICIONES DE AREAS Y VOLUMENES CEREBRALES.

Tras fijar el cerebro en formol, se separó el cerebelo y tronco que no entraban en las mediciones. Se cortaron con cuchilla y bajo lupa óptica los hemisferios cerebrales en seis bloques de igual grosor por medio de cortes coronales perpendiculares al eje anteroposterior. Los hemisferios cerebrales de la rata miden en dicho eje anteroposterior aproximadamente 12 mm., por lo que cada bloque tenía un grosor de alrededor de 2 mm. Dichos bloques eran procesados de forma convencional para histología e incluidos en parafina, haciéndose una preparación con el microtomo de la cara posterior de cada bloque y desgastándolo hasta la mitad para sacar otra preparación a mitad del bloque, excepto en el último bloque en el que la cara posterior del bloque coincidía con la del hemisferio, por lo que su superficie era cero y solo se sacaba la preparación de la mitad del bloque.

Así teníamos 11 preparaciones histológicas, que teñimos con hematoxilina-eosina, y en las que medíamos áreas de cerebro normal y de infarto, como veremos en la sección de variables dependientes. De cada bloque de 2 mm. resultaban dos preparaciones, que por lo tanto estaban hechas cada 1 mm., y multiplicando cada área por esta cantidad y sumándolas todas teníamos el volumen cerebral tanto de todo el cerebro, como de algunas estructuras que se medían por separado (ganglios basales, corteza total, corteza pre y post-rolándica, ventrículos, artefacto) así como del infarto total y del que afectaba a las diferentes partes del cerebro.

Al tener 11 preparaciones (en realidad muchas más, pues se sacaban tres

cortes de cada una por si había algún defecto de procesamiento) de cada uno de los 81 animales que se estudiaron entre los dos experimentos, obtuvimos 891 preparaciones, y sobre cada una de ellas se realizaron las mediciones. De cada preparación se midieron área cerebral total, área de ganglios basales en ambos hemisferios, área de infarto total y de infarto de ganglios basales y área ventricular, y área de artefacto si existía, por lo que sobre las 891 preparaciones se determinaron 5.346 parámetros. Cada parámetro era el resultado de promediar 3 mediciones, por lo que hubieron de hacerse 16.038 mediciones. Con éstas determinaciones se calcularon los volúmenes de infarto que constituían las variables dependientes, así como el volumen cerebral total.

Las mediciones se realizaron por medio de un programa de ordenador de morfometría (VIDS V de la casa Synoptics instalado en un ordenador IBM 8580-OH) por medio de un microscopio Nikon al que estaba conectada la cámara de vídeo TK-1070 E de la casa JVC que proyectaba su imagen en una pantalla, donde se podía medir por medio de una tabla con ratón.

C.8 DEFINICION DE LAS VARIABLES.

C.8.1 VARIABLES EN EL EXPERIMENTO SOBRE GLUCEMIA E INFARTO CEREBRAL.

En el experimento sobre glucemia e infarto cerebral, la variable independiente que modificamos en los grupos experimentales es la glucemia. La que denominamos **variable independiente principal**, por considerarla la más representativa de la glucemia, es la **glucemia ponderada en el tiempo (GLUCEMP)**, pues como se ha referido, los intervalos entre los que se medía la glucemia no eran iguales. Para calcularla, cada valor se multiplicó por el intervalo hasta la siguiente medición en horas y se dividió por las 24 horas que duraba el

experimento. Otra variable independiente que se determinó fue la media aritmética de las glucemias (GLUCEMM). La glucemia basal (GLUCEMB) no era manipulada excepto en el grupo 4 de hipoglucemia previa en el que la hipoglucemia se provocaba antes de la determinación basal de la glucemia. En todos los grupos la glucemia basal era previa a la cirugía.

Las variables dependientes han sido diferentes mediciones del volumen de infarto cerebral. En concreto la **variable dependiente principal era el volumen proporcional de infarto (VOLPROI)**, que consistía en el porcentaje del volumen cerebral total que sufría infarto. Se calculaba así para evitar que hubiera ratas que tuvieran mayor volumen de infarto por el hecho de tener mayor peso corporal y mayor volumen cerebral. Por ello le dimos más valor a esta variable que a la del volumen total de infarto (VOLTOI). Para hacer éste cálculo tuvimos que calcular por planimetría el volumen cerebral total (VOLTCP).

Como en los cerebros el volumen ventricular es distinto de una a otra rata y en algunas ratas había un pequeño artefacto en la superficie cerebral donde se realizaba la coagulación del vaso, nos preguntamos si las diferencias que hubiera entre los grupos respecto al volumen proporcional de infarto se mantendrían si se calculara de nuevo el volumen proporcional de infarto tras restar del volumen cerebral total el artefacto (VOLPI-A), el volumen ventricular (VOLPI-V) o ambos (VOLPI-VA).

Nos interesaba también saber si las diferentes condiciones experimentales afectaban de manera desigual a las distintas zonas cerebrales irrigadas por la arteria cerebral media. Para ello se calculó el volumen total de infarto en los ganglios basales (VOLTIGB) y el porcentaje del infarto que correspondía a los ganglios basales sobre el volumen cerebral total (VOLPIGB) siguiendo una atlas estereoatáxico de cerebro de rata (PELLIGRINO, 1979) (ver **Figura 4**). Asimismo calculamos el volumen total de infarto de la corteza cerebral (VOLTICOR), y el porcentaje de infarto que correspondía a la corteza (VOLPICOR), así como qué porcentaje del infarto cortical era anterior (VOLIPRES) al surco de Rolando, y cuánto era posterior (VOLIPPOS).

Existían también una serie de variables a controlar que queríamos saber si estaban distribuidas de forma no homogénea en los diferentes grupos por si hubieran podido sesgar los resultados. Estas variables eran: el peso, dosis por 100 grs. de anestésico (atropina, diacepam, ketamina que constituían las variables ATRO100, DIAC100 y KETA100), volumen de artefacto (VOLART) y volumen de los ventrículos (VOLVENT). Otras variables que se midieron en este experimento fueron el pH, pO_2 y pCO_2 en sangre arterial, la hemoglobina inicial (HBI) y final (HBF), así como la diferencia entre ellas (IHB). Ya adelantamos que no hubo diferencias significativas entre los grupos respecto a estos parámetros excepto en el caso del peso, por lo que para corregir cualquier sesgo se utilizó como se ha referido el porcentaje de volumen cerebral infartado (VOLPROI) como variable dependiente principal.

C.8.2 VARIABLES EN EL EXPERIMENTO SOBRE TEMPERATURA E INFARTO CEREBRAL.

Se calcularon igual que en el experimento anterior sobre la glucemia, tanto la **variable dependiente principal (el volumen proporcional de infarto, VOLPROI)**, como el resto de las variables dependientes (mediciones del volumen de infarto total: VOLTOI; mediciones del infarto total y proporcional de ganglios basales: VOLTGB y VOLPIGB; mediciones del infarto total y proporcional de corteza y de corteza: VOLTICOR y VOLPICOR; mediciones del infarto anterior y posterior al surco de Rolando: VOLIPRES y VOLIPOS).

Se utilizaron también algunas de las mismas variables de control que en el experimento anterior: peso, dosis por 100 grs. de los tres componentes de anestésico y volumen de artefacto y ventricular. Como veremos, en ninguna de ellas, incluyendo el peso, hubo diferencias significativas entre los grupos.

La **variable independiente principal** que se modificó fue la **temperatura cerebral ponderada en el tiempo (TEMPPC)** calculada promediando diez valores

de temperatura cerebral sacadas de un registro continuo de temperatura cerebral. Otras variables independientes secundarias propias de éste experimento fueron: temperatura cerebral media (TEMPMC) que al no estar ponderada en el tiempo se veía mas influida por desviaciones aunque fueran de breve duración, y las temperaturas rectal ponderada en el tiempo y temperatura media rectal (TEMPPR y TEMPMR) que mostraban a la temperatura a la que había estado el resto del organismo durante el experimento y que se medían al tiempo que la temperatura cerebral.

C.9 METODOS ESTADISTICOS.

C.9.1 METODOS ESTADISTICOS EN EL EXPERIMENTO SOBRE GLUCEMIA E INFARTO CEREBRAL.

Para dar contestación a las preguntas planteadas en el capítulo de OBJETIVOS, se diseñó un experimento de laboratorio que permitiese la comprobación de estos extremos. Con las condiciones especificadas en el apartado C.2 GRUPOS EXPERIMENTALES, se establecieron cuatro grupos experimentales:

- * Grupo 1 (HIPERGLUCEMIA): Se provoca una hiperglucemia dos horas tras haber provocado el infarto cerebral. 14 animales.

- * Grupo 2 (NORMOGLUCEMIA): Se mantiene la glucemia en límites normales controlándola desde dos horas después de que se provoca el infarto cerebral. Si es necesario se utiliza insulina para contrarrestar la hiperglucemia reactiva al estrés. 7 animales.

- * Grupo 3 (HIPOGLUCEMIA POSTERIOR): Se provoca una hipoglucemia por medio de insulina intravenosa a las dos horas de provocar el infarto cerebral. 8 animales.

* Grupo 4 (HIPOGLUCEMIA PREVIA): Se provoca una hipoglucemia con insulina intravenosa inmediatamente antes de provocar el infarto cerebral. 10 animales.

Se asignaron los animales a estos grupos de forma aleatoria y se analizaron los volúmenes de infarto cerebral desconociendo al medirlos varios días o semanas después de sacrificar el animal, el grupo experimental al que correspondía el cerebro analizado y los niveles de glucemia que había tenido.

El nivel de glucemia que manipulábamos constituyó la variable independiente. El volumen de infarto cerebral constituyó la variable dependiente. En concreto la variable dependiente principal era la proporción del volumen cerebral total que sufría infarto (VOLPROI), por las razones que se han expuesto más arriba. El resto de los volúmenes de infarto constituían las variables dependientes secundarias, y las variables de control de las condiciones experimentales, tal como se han definido en el apartado C.10.1 de definición de variables en el experimento de la glucemia y la temperatura.

Los grupos de investigación abarcaban todas las variaciones posibles de la glucemia, incluyendo la normoglucemia, lo que permitiría comparaciones entre ellos.

La escala de medida natural de las variables tanto independientes como dependientes iba a ser la numérica continua lo que facilitaría los cálculos y métodos estadísticos a utilizar.

Se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$ para todas las pruebas estadísticas utilizadas.

Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 5.1 con los distintos procedimientos que se irán señalando en su lugar.

Para la primera pregunta enunciada en OBJETIVOS, consistente en si los niveles de glucemia mantenían una relación con las variables dependientes (volumen de infarto), estudiaríamos dicha relación por medio de una regresión simple

bivariante de las variables dependientes sobre las independientes. Como en el grupo 4 de hipoglucemia previa a la provocación del infarto las cifras de glucemia no eran comparables a las de los otros grupos, pues tenían un patrón temporal diferente, se excluyó de este análisis y se aplazó para la comparación entre grupos. Por medio de este cuarto grupo se intentaría responder a la segunda pregunta, referente a la influencia del patrón temporal de la hipoglucemia.

La tercera pregunta consistía en determinar cómo influían distintos niveles de glucemia, caracterizados en cuatro grupos, en el volumen de infarto cerebral. Esto requiere un análisis de la varianza de un factor, con el que estudiaríamos si existían diferencias de volumen de infarto entre los grupos, y si éste era el caso, haríamos comparaciones entre los cuatro grupos por medio de un test de comparaciones múltiples que juzgamos oportuno fuera el de Student-Neumann-Keuls.

Unas cuestiones preliminares de procedimiento nos obligarían a comprobar la distribución de las variables ya que se dispondría de escaso número de participantes, cosa comprensible en estudios de experimentación animal con modelos complejos como el utilizado, y podría ser crítica la aplicación de cálculos paramétricos. Igualmente comprobaríamos si se habían caracterizado bien sobre la realidad los grupos de estudio. Todo ello se detalla en el apartado de **RESULTADOS**.

C.9.2 METODOS ESTADISTICOS EN EL EXPERIMENTO SOBRE TEMPERATURA E INFARTO CEREBRAL.

La variable independiente que manipulamos es en este caso la temperatura, por los medios que se explican en **MATERIAL Y METODOS**. Las variables dependientes son los volúmenes de infarto cerebral, y al igual que las variables secundarias a controlar, son las mismas que en el estudio anterior excepto que en este caso no se controlaron el pH y gases ni la hemoglobina inicial, aunque sí la final. Era conveniente limitar el número de extracciones sanguíneas para evitar

hipotensiones, dado que la rata tiene un volumen circulante pequeño y en este experimento los animales no recibían líquido intravenoso.

Al igual que en el experimento de la glucemia, las variables tienen en todos los casos medida numérica y su análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 5.1.

Inicialmente se estudiaría la relación entre las variables independientes (temperatura) y las dependientes (volumen de infarto cerebral) por medio de un análisis de regresión simple bivariante. Posteriormente se analizaría si comparando los dos grupos (normotermia e hipotermia) por medio del test t de comparación de medias de Student se observaban diferencias respecto a la variable dependiente (volumen de infarto cerebral).

Previamente era necesario comprobar si las variables se ajustaban a una distribución normal y si los dos grupos estaban bien caracterizados respecto a la temperatura, lo que tratamos a continuación en el apartado de **RESULTADOS**.

D. RESULTADOS

D.1 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO SOBRE GLUCEMIA E INFARTO CEREBRAL.

D.1.1 AJUSTE DE LAS VARIABLES A LA DISTRIBUCION NORMAL

Como hemos dicho, todas las variables son numéricas. Se procede a comprobar si tienen una distribución normal, ya que la muestra no es muy numerosa (39 casos) y si la distribución no fuera normal podría resultar dudosa la aplicación a ella de los cálculos paramétricos que pretendíamos hacer.

Las comprobaciones se realizaron mediante la observación de las estadísticas descriptivas, con sus valores de kurtosis y asimetría y mediante la aplicación del test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff que debía tener una significación menor de 0.05.

Todas las variables se ajustaban a una distribución normal excepto las variables independientes GLUCEMM, GLUCEMP (0.0492), las variables dependientes VOLPIGB; VOLTIGB, y la variable secundaria ATRO100. Estas variables por lo tanto se estudiarían mediante tests no paramétricos.

D.1.2 REGRESION LINEAL SIMPLE.

Se efectuó un análisis de regresión simple bivariante, de las variables independientes sobre las dependientes de los tres primeros grupos dado que el cuarto, como se ha dicho no era comparable, al haber sido modificadas las variables independientes con diferente cronología. No se tuvo en cuenta por tanto de momento la existencia de estos tres grupos de estudio.

No se encontró una correlación lineal significativa entre las variables independientes y las dependientes lo que parece indicar que en este modelo no existe una relación lineal entre los incrementos o disminuciones de la glucosa y el volumen del infarto cerebral.

Tampoco existe una correlación lineal significativa entre las variables secundarias a controlar, y las dependientes, lo que nos hace pensar que las variables secundarias no influyeron en los resultados del experimento, y por tanto no contaminan resultados de posteriores análisis.

D.1.3 EXAMEN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

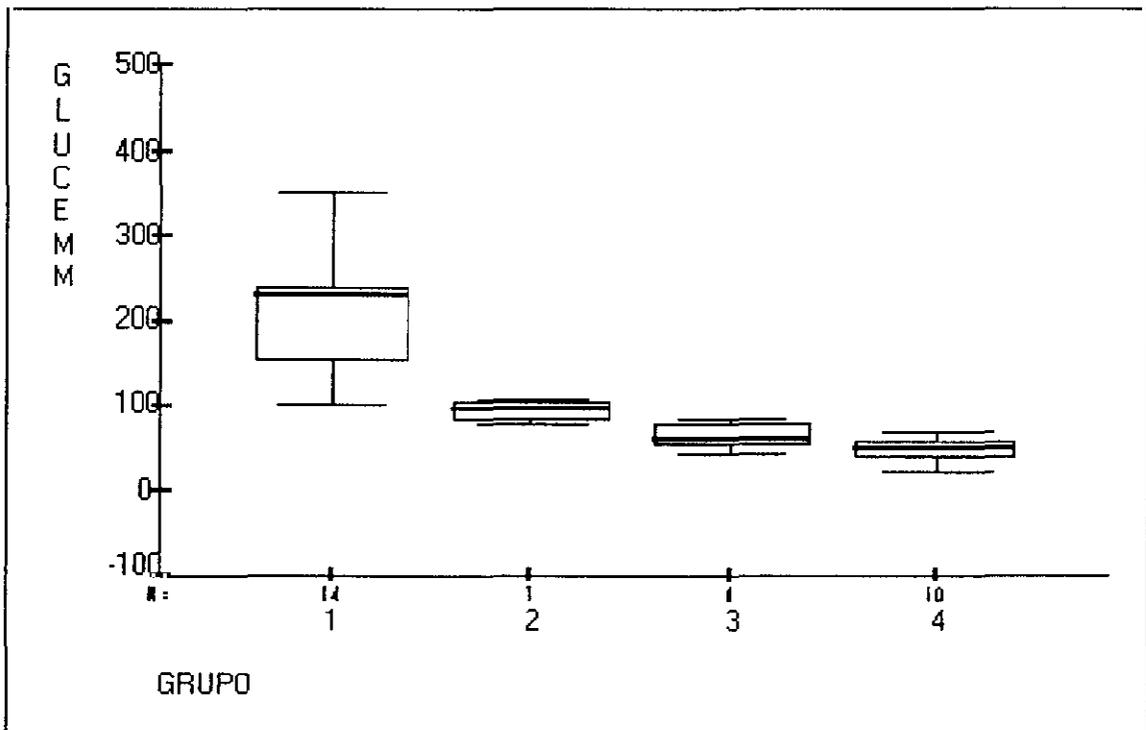
El siguiente paso fue determinar si los tres grupos de estudio están bien caracterizados como grupos individuales con respecto a todas las variables independientes (o a los diferentes aspectos que adquiere la variable independiente), para ver si se habían conseguido unas condiciones de validez interna del experimento.

Se muestra en los siguientes gráficos de cajas (**Gráficos 1-3**) la caracterización de las variables independientes. En dichos gráficos la caja abarca el 75% de la muestra, que queda comprendida en su totalidad por las líneas horizontales superior e inferior. La línea en el interior de la caja es la mediana y por lo tanto divide la muestra en dos mitades con igual número de sujetos.

Como se muestra a continuación para la variable **GLUCEMM**, existe una distribución adecuada para cada grupo, y los valores de la hiperglucemia, como solo tienen límite inferior, son lógicamente más dispersos que los de la normoglucemia o los dos de la hipoglucemia, que se encuentran en los límites estrechos preestablecidos.

Variable GLUCEMM (glucemia, media aritmética):

Como puede observarse a continuación (**Gráfico 1; Tabla 1**), la distribución de los tres grupos con respecto a la variable GLUCEMM (la media aritmética de todos los valores de glucemia) es buena, estando situado el grupo 1 de hiperglucemia por encima del 2 de normoglucemia, y éste por encima de los dos de hipoglucemia, como se supone que debe suceder. Al no seguir la variable una distribución normal, se aplicó un test no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) para comparación de medias, el cual establece que hay diferencias significativas entre la glucemia media de los tres grupos con niveles de significación de $p < 0,0001$



Gráfica 1

Tabla 1. Diferencias de los 4 grupos de estudio por el parámetro GLUCEMM.

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE (KRUSKAL-WALLIS)
1-HIPERGLUCEMIA	14	220,117	24,186	Chi ² = 32,187 p < 0,0001
2-NORMOGLUCEMIA	7	95,427	4,494	
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	64,862	4,935	
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	49,984	4,725	

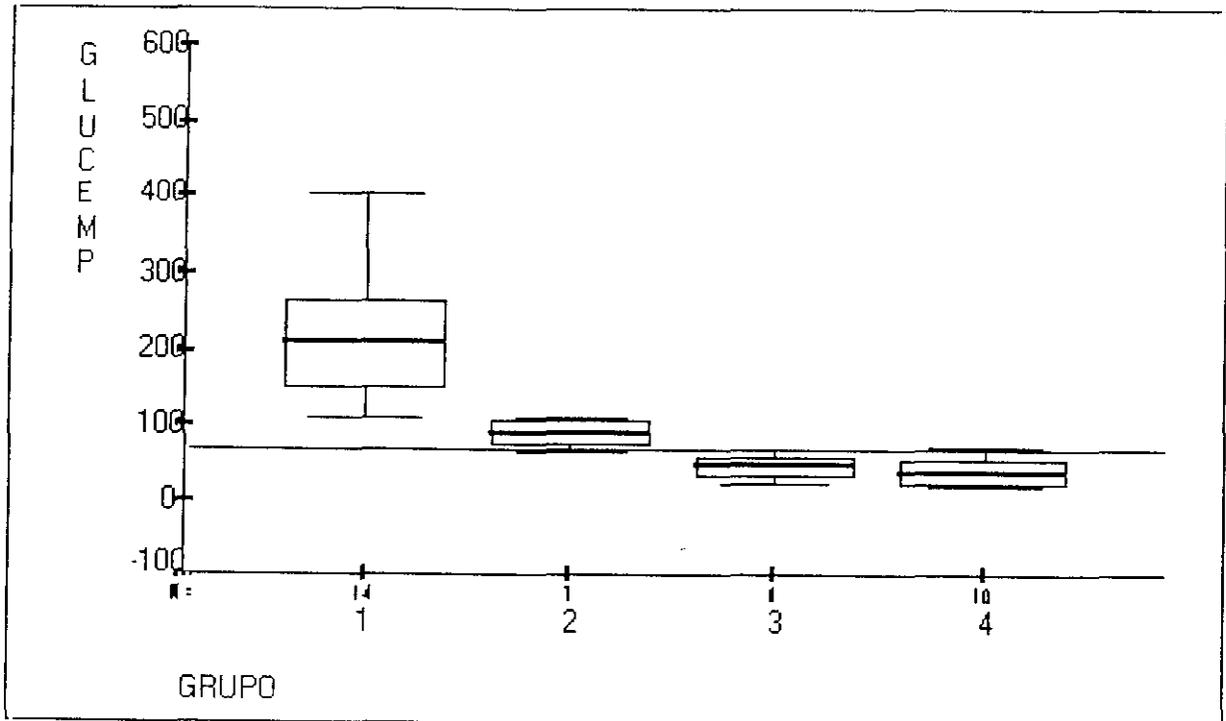
Variable GLUCEMP (glucemia, media ponderada en el tiempo):

Con respecto a esta variable y lo mismo que ocurría con la anterior, los grupos se sitúan de una manera descendente como cabe esperar que suceda (hiper-, normo-, hipoglucemia) y podemos ver en el gráfico siguiente (**Gráfico 2**).

Como se explicó en **MATERIAL Y METODOS**, la variable GLUCEMP (glucemia media ponderada en el tiempo) resulta de promediar los valores de glucemia e introducir un factor corrector del tiempo que se ha mantenido dicho valor de glucemia (cada valor de glucemia se multiplica por el número de horas de las 24 que se ha mantenido dicho valor, y luego se divide por 24).

Al tener en cuenta el tiempo, es la variable independiente que nos parece que refleja mejor la realidad, por lo que la hemos utilizado para clasificar los 4 grupos en hiper, normo o los 2 de hipoglucemia. Vemos por una línea en el gráfico trazada al nivel de 70 mg/dl como éste valor separa los grupos de hipoglucemia de los demás.

La comparación de las medias nos dice que los grupos son diferentes desde el punto de vista estadístico, como puede verse en la siguiente tabla (**Tabla 2**).



Gráfica 2

Tabla 2. Diferencias de los 4 grupos de estudio por el parámetro GLUCEMP.

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE (KRUSKAL-WALLIS)
1-HIPERGLUCEMIA	14	245,745	35,458	Chi ² = 32,187 p < 0,0001
2-NORMOGLUCEMIA	7	88,877	6,390	
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	46,848	5,431	
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	44,503	6,950	

Dado que el test de Kolmogorov-Smirnov para ajuste a la distribución normal dió un valor límite para esta variable ($p=0,0492$), y el test de Levene mostró inhomogeneidad de varianzas, se realizó test no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) que mostró que existían diferencias significativas entre los grupos con respecto a esta variable.

Variable GLUCEMB (glucemia basal):

Como puede verse en el gráfico y tabla siguientes (Gráfico 3, Tabla 3) la glucemia inicial o basal (GLUCEMB), era menor en el grupo 4 de hipoglucemia previa, mientras que en el resto no había grandes diferencias.

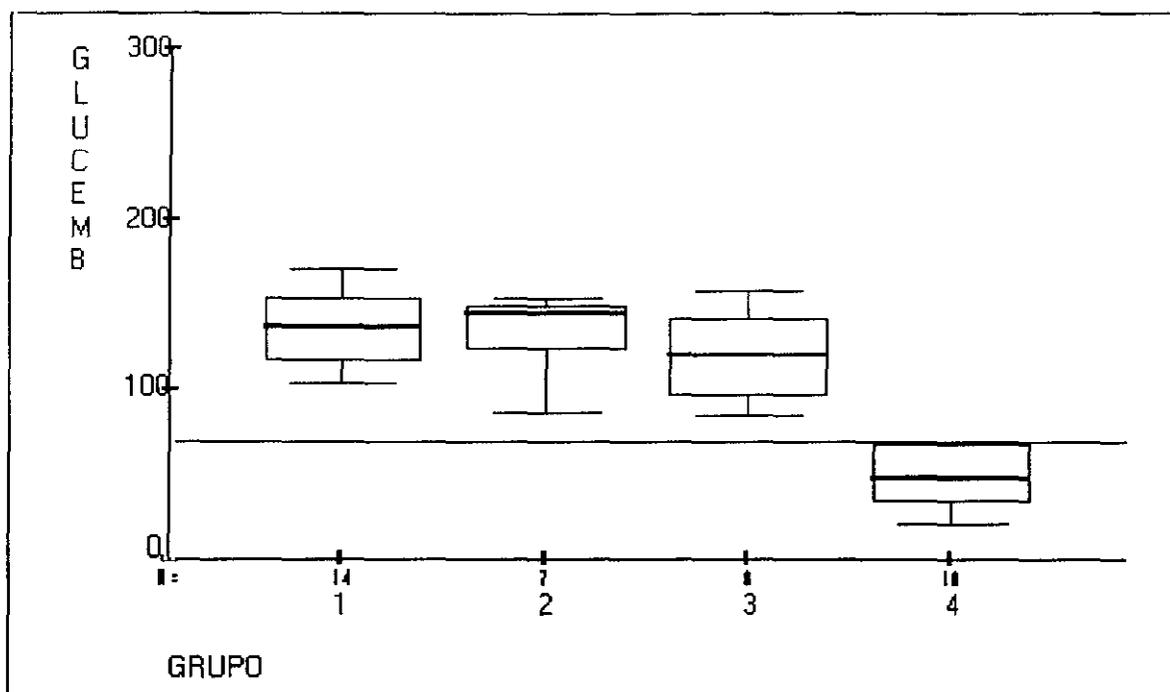


Gráfico 3

Tabla 3. Diferencias de los 4 grupos de estudio por el parámetro GLUCEMB.

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
1-HIPERGLUCEMIA	14	148,785	12,568	F= 18,58 p < 0,0001
2-NORMOGLUCEMIA	7	133,428	9,012	
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	120,625	9,039	
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	48	5,576	

MORTALIDAD.

Como puede verse en la tabla siguiente, las diferencias en cuanto a mortalidad no son estadísticamente significativas.

Tabla 4. Diferencias de mortalidad entre los 4 grupos.

GRUPOS	N	MUERTES	PORCENTAJE	CONTRASTE
1-HIPERGLUCEMIA	14	3	21,428	Chi ² p = 0,879 (n. s.)
2-NORMOGLUCEMIA	7	1	14,285	
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	1	12,25	
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	1	10	

D.1.4 ANALISIS DE LA VARIANZA.

El siguiente paso, que debía constituir el cuerpo del experimento, fue practicar un análisis de la varianza de un factor, con el test de Student-Neuman-Keuls para comparaciones múltiples que enfrentara los 4 grupos en estudio respecto a las variables independientes manipuladas y las dependientes resultado de la manipulación.

Cuando aplicado el test de Levene no existía homogeneidad de varianzas ($p < 0,05$), se aplicó un test no paramétrico (test de Kruskal-Wallis). Esto sucedió con las siguientes variables: ATRO100 (secundaria), VOLPIGB, VOLTIGB (dependientes) y GLUCEMM, GLUCEMP las dos últimas ya analizadas con este test en el apartado anterior.

No existen diferencias significativas entre los cuatro grupos respecto a las siguientes variables: ATRO100, DIAC100 (atropina y diacepam en anestésico por 100 grs. de peso de rata), HBF, HBI, IHB(hemoglobina inicial, final y su diferencia), pCO_2 , pO_2 (presiones parciales de anhídrido carbónico y oxígeno), PESO, VOLART, VOLVENT (volúmenes de artefacto y ventricular), VOLPICOR, VOLTICOR (volumenes ponderado y total de infarto cortical). Todas estas variables, (exceptuando las dos últimas) son variables secundarias a controlar, y por tanto, al estar distribuidas homogéneamente entre los grupos, no es probable que hayan contaminado el experimento.

Globalmente los 4 grupos de estudio son significativamente diferentes respecto a las siguientes variables dependientes (Tabla 5), cuyas abreviaturas pueden consultarse en las páginas iniciales. Podemos ver que entre estas variables que difieren entre los grupos, se halla la variable dependiente principal VOLPROI (volumen de infarto proporcional al volumen cerebral total), por lo que puede decirse que las distintas condiciones experimentales se asocian a infartos cerebrales de distinto tamaño.

Tabla 5. Los 4 grupos son significativamente distintos respecto a las siguientes variables.

<u>VARIABLE</u>	<u>SIGNIFICACION (F)</u>
VOLPROI	0,0297
VOLTOTI	0,0078
VOLPROI-A	0,0295
VOLPROI-V	0,0311
VOLPROI-VA	0,0306
VOLIPRES	0,0094
VOLIPOS	0,0098
VOLPIGB	0,0011
VOLTIGB	0,0006
VOLTCP	0.0002

Pasamos ahora a analizar para cada una de las variables dependientes en las que existe diferencia significativa, los grupos concretos entre los cuales se produce dicha diferencia. Como anteriormente, se ha utilizado el test para comparación múltiple de medias de Student-Neumann-Keuls, cuyos resultados se expresan en las **Tablas 8-28**.

VOLUMEN DE INFARTO PROPORCIONAL AL VOLUMEN CEREBRAL TOTAL (VOLPROI) Y VOLUMEN TOTAL DE INFARTO (VOLTOI).

Las dos primeras tablas (Tablas 6 y 7), reflejan la estadística descriptiva (media y desviación estándar) de las dos variables dependientes volumen proporcional de infarto (VOLPROI) y volumen total de infarto (VOLTOI).

Tabla 6. Estadística descriptiva del volumen proporcional de infarto (VOLPROI)

GRUPO	N	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR
1-HIPERGLUCEMIA	14	11,147	5,409
2-NORMOGLUCEMIA	7	8,687	6,487
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	11,936	6,093
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,740	4,693

Tabla 7. Estadística descriptiva del volumen total de infarto (VOLTOI).

GRUPO	N	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR
1-HIPERGLUCEMIA	14	144,441	73,532
2-NORMOGLUCEMIA	7	103,497	93,284
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	159,546	76,874
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	47,594	50,512

Como puede observarse en las cuatro tablas que siguen, tanto el volumen total de infarto (VOLTOI), como el volumen proporcional al volumen cerebral total (VOLPROI), variable que consideramos como la más relevante entre las dependientes, son significativamente menores en el grupo 4 en el que se produjo la hipoglucemia previamente a la oclusión de la arteria cerebral media, que en el grupo 3 de hipoglucemia (provocada después de la oclusión de la arteria cerebral media) y que en el grupo 1 de hiperglucemia.

El grupo 4 de hipoglucemia previa tiene volúmenes proporcionales de infarto (VOLPROI, **Tabla 6**) aproximadamente de la mitad que el grupo 2 de normoglucemia, la situación de referencia. Aunque la diferencia entre ambos no es estadísticamente significativa (probablemente por que el número de sujetos es bajo), una diferencia tan importante sugiere un efecto beneficioso de la hipoglucemia previa, el grupo con menores volúmenes de infarto de los estudiados.

Por ello, las diferencias significativas (siempre utilizando el test de Student-Neumann-Keuls) que se muestran en las siguientes **Tablas 8-11** pueden interpretarse como que la hipoglucemia previa al infarto cerebral (grupo 4) ejerce un papel protector, y que la hiperglucemia (grupo 1) y la hipoglucemia tras el infarto (grupo 3), que son las situaciones con mayores volúmenes de infarto cerebral, aumentan la extensión de dicho infarto.

Tabla 8. Diferencias significativas en Volumen proporcional de infarto (VOLPROI).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,740	1,484	1,38 a 8,09
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	11,936	2,154	6,84 a 17,03

Tabla 9. Diferencias significativas en Volumen proporcional de infarto (VOLPROI).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,740	1,484	1,38 a 8,09
1-HIPERGLUCEMIA	14	11,147	1,445	8,02 a 14,27

Tabla 10. Diferencias significativas en Volumen total de infarto (VOLTOI).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	47,594	15,973	11,45 a 83,72
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	159,54	27,179	95,27 a 223,81

Tabla 11. Diferencias significativas en Volumen total de infarto (VOLTOI).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	47,594	15,973	11,45 a 83,72
1-HIPERGLUCEMIA	14	144,44	19,652	101,98 a 186,89

VOLUMENES DE INFARTO EXCLUYENDO EL ARTEFACTO (VOLPROI-A), EXCLUYENDO EL VOLUMEN VENTRICULAR (VOLPROI-V) Y EXCLUYENDO AMBOS (VOLPROI-VA).

Como se ve en las seis tablas que siguen (Tablas 12-18), las diferencias que acabamos de referir arriba entre el grupo 4 de hipoglucemia previa y tanto el grupo 1 de hiperglucemia como el grupo 3 de hipoglucemia posterior al infarto cerebral, se mantienen después de restar al volumen cerebral total, elementos que pudieran haber contaminado el experimento, como son el artefacto quirúrgico producido (si es que se produjo), el volumen ventricular, y la suma de ambos.

Tabla 12. Diferencias significativas en Volumen total de infarto excluyendo el artefacto (VOLPROI-A).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,750	1,482	1,39 a 8,10
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	11,942	2,153	6,48 a 17,03

Tabla 13. Diferencias significativas en Volumen total de infarto excluyendo el artefacto (VOLPROI-A).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,750	1,482	1,39 a 8,10
3-HIPERGLUCEMIA	14	11,180	1,448	8,05 a 14,31

Tabla 14. *Diferencias significativas en Volumen total de infarto excluyendo los ventriculos (VOLPROI-V).*

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	9,33	0,982	7,34 a 11,31
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	12,006	2,159	6,90 a 17,11

Tabla 15. *Diferencias significativas en Volumen total de infarto excluyendo los ventrículos (VOLPROI-V).*

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	9,33	0,982	7,34 a 11,31
3-HIPERGLUCEMIA	14	11,302	1,458	8,15 a 14,45

Tabla 16. *Diferencias significativas en Volumen total de infarto excluyendo los ventriculos y el artefacto (VOLPROI-VA).*

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,834	1,535	1,35 a 8,30
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	12,011	2,158	6,90 a 17,11

Tabla 17. Diferencias significativas en Volumen total de infarto excluyendo los ventrículos y el artefacto (VOLPROI-VA).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	4,834	1,535	1,35 a 8,30
3-HIPERGLUCEMIA	14	11,332	1,460	8,17 a 14,48

Tabla 18. Diferencias significativas en Volumen total de infarto (VOLTOI).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	47,594	15,973	11,45 a 83,72
1-HIPERGLUCEMIA	14	144,44	19,652	101,98 a 186,89

VOLUMEN DE INFARTO PRE Y POSTROLANDICO (VOLIPRE y VOLIPOS).

Aproximadamente la mitad anterior de la corteza irrigada por la arteria cerebral media es prerolándica y la mitad posterior es postrolándica. Para averiguar si en dicha corteza existen zonas en las que las condiciones experimentales pudieran aumentar o disminuir el infarto cerebral (y por lo tanto cambiar la distribución del mismo) se midió el volumen de infarto que era anterior a la cisura de Rolando, y el

volumen que era posterior a la misma. Aquí la medida no es un volumen sino el porcentaje de infarto cortical que es anterior y el que es posterior a la cisura de Rolando.

Vemos en las cuatro tablas siguientes (Tablas 19-22), que en el grupo 4 con hipoglucemia previa a la cirugía la mayor proporción del infarto es anterior a la cisura de Rolando, mientras que en los grupos 1 de hiperglucemia y 3 de hipoglucemia posterior al infarto, la mayor parte del infarto se sitúa posterior a dicha cisura. Por lo tanto, la hipoglucemia previa parece reducir el infarto especialmente en el área de la arteria cerebral media posterior a la cisura de Rolando.

Tabla 19. Diferencias significativas en proporción del volumen de infarto anterior a la cisura de Rolando (VOLIPRES).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	60,145	5,907	46,78 a 73,50
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	38,482	7,349	21,10 a 55,86

Tabla 20. Diferencias significativas en proporción del volumen de infarto anterior a la cisura de Rolando (VOLIPRES).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	60,145	5,907	46,78 a 73,50
3-HIPERGLUCEMIA	14	37,772	7,142	28,82 a 46,72

Tabla 21. Diferencias significativas en proporción del volumen de infarto posterior a la cisura de Rolando (VOLIPOS).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	37,736	5,902	26,38 a 53,08
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	61,508	7,348	44,13 a 78,88

Tabla 22. Diferencias significativas en proporción del volumen de infarto posterior a la cisura de Rolando (VOLIPOS).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	37,736	5,902	26,38 a 53,08
3-HIPERGLUCEMIA	14	62,007	4,181	52,97 a 71,04

VOLUMEN TOTAL DE INFARTO DE GANGLIOS BASALES (VOLTIGB) Y PROPORCIONAL (VOLPIGB) AL VOLUMEN CEREBRAL TOTAL.

El infarto cerebral se clasificó en cortical y de ganglios basales. El infarto de ganglios basales se comparó para los diferentes grupos.

En las tablas siguientes (Tablas 29 y 30) se comprueba que se mantienen las diferencias anteriores: en el grupo 4 de hipoglucemia previa el infarto de ganglios basales es significativamente menor que en los grupos 1 de hiperglucemia y el 3 de hipoglucemia tras el infarto cerebral.

Tabla 23. *Diferencias significativas en el volumen proporcional de infarto de ganglios basales (VOLPIGB).*

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE (KRUSKAL-WALLIS)
1-HIPERGLUCEMIA	14	2,375	0,476	Chi ² = 16,770 p < 0,0001
2-NORMOGLUCEMIA	7	1,081	0,589	
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	2,370	0,441	
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	0,074	0,051	

Tabla 24. Diferencias significativas en el volumen total de infarto de ganglios basales (VOLTIGB).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE (KRUSKAL-WALLIS)
1-HIPERGLUCEMIA	14	30,324	6,054	Chi ² = 18,368 p = 0,0004
2-NORMOGLUCEMIA	7	12,474	6,705	
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	32,492	6,408	
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	0,802	0,580	

VOLUMEN CEREBRAL TOTAL CALCULADO POR PLANIMETRIA (VOLTCP).

El volumen cerebral podía calcularse como el volumen de fluido que desplaza el cerebro al ser sumergido en él, pero éste método nos pareció inexacto, al tener el cerebro un volumen tan pequeño (alrededor de 1 ml.). Además, para tener una mayor homogeneidad en los métodos, quisimos usar el utilizado para el resto de las mediciones, incluido el volumen de infarto. Por ello se empleó la planimetría con el aparataje y métodos señalados en la sección de **MATERIAL Y METODOS**.

Como muestran las tablas siguientes (**Tablas 25-28**), los volúmenes cerebrales no resultaron homogéneos entre los diferentes grupos, a pesar de tener las ratas la misma procedencia, no haber diferencias de peso entre los grupos, y un peso homogéneo y ser escogidas al azar. Esto no supone ningún inconveniente, al haber calculado todos los volúmenes tanto en su valor total, como en su valor

proporcional al volumen cerebral total, lo que elimina la influencia que pudiera tener el que los grupos tuvieran volúmenes cerebrales diferentes.

En concreto, respecto al volumen cerebral, los grupos fueron diferentes entre sí excepto el 2 de normoglucemia que no difería del 4 de hipoglucemia previa, y el 1 de hiperglucemia que tenía un volumen cerebral similar al 3 de hipoglucemia posterior al infarto.

Tabla 25. Diferencias significativas en Volumen total cerebral calculado por planimetría (VOLTCP).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	974,503	28,350	910,36 a 1038,63
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	1360,24	48,477	1245,61 a 1474,8

Tabla 26. Diferencias significativas en Volumen total cerebral calculado por planimetría (VOLTCP).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
4-HIPOGLUCEMIA PREVIA	10	974,503	28,350	910,36 a 1038,63
1-HIPERGLUCEMIA	14	1 279,60	57,628	1155,10 a 1404,0

Tabla 27. Diferencias significativas en Volumen total cerebral calculado por planimetría (VOLTCP).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
2-NORMOGLUCEMIA	7	1093,53	94,911	861,29 a 1325,77
1-HIPERGLUCEMIA	14	1 279,60	57,628	1155,10 a 1404,0

Tabla 28. Diferencias significativas en Volumen total cerebral calculado por planimetría (VOLTCP).

GRUPOS	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	INTERVALO CONF. 95%
2-NORMOGLUCEMIA	7	1093,53	94,911	861,29 a 1325,77
3-HIPOGLUCEMIA POSTERIOR	8	1360,24	48,477	1245,61 a 1474,8

D.2 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO SOBRE HIPOTERMIA E INFARTO CEREBRAL.

D.2.1 AJUSTE DE LAS VARIABLES A LA DISTRIBUCION NORMAL.

Se realizó por medio del test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff. Todas las variables tenían una distribución normal excepto las variables dependientes VOLPIGB, VOLTIGB y VOLVENTP y las variables independientes TEMPBC, TEMPPR (las dos últimas tienen además varianzas no homogéneas).

En estos casos el análisis hubo de hacerse con una prueba no paramétrica para comparación de dos muestras independientes que fue la U de Mann-Whitney.

También fue necesario utilizar esta prueba cuando el test de Levene mostraba que las varianzas no eran homogéneas, lo que sucedió en las siguientes variables dependientes: VOLIPOS, VOLIPRES, VOLPIGB, VOLTIGB, VOLTOI; en las variables independientes: TEMPMC, TEMPMR, TEMPPC, TEMPPR; y en las variables secundarias ATRO100, , DIAC100, KETA100, HBF, PESO. En todas ellas se utilizó la U de Mann-Whitney.

En el resto de los casos, y siempre que no se indica lo contrario, se utilizó una prueba paramétrica: la t de Student.

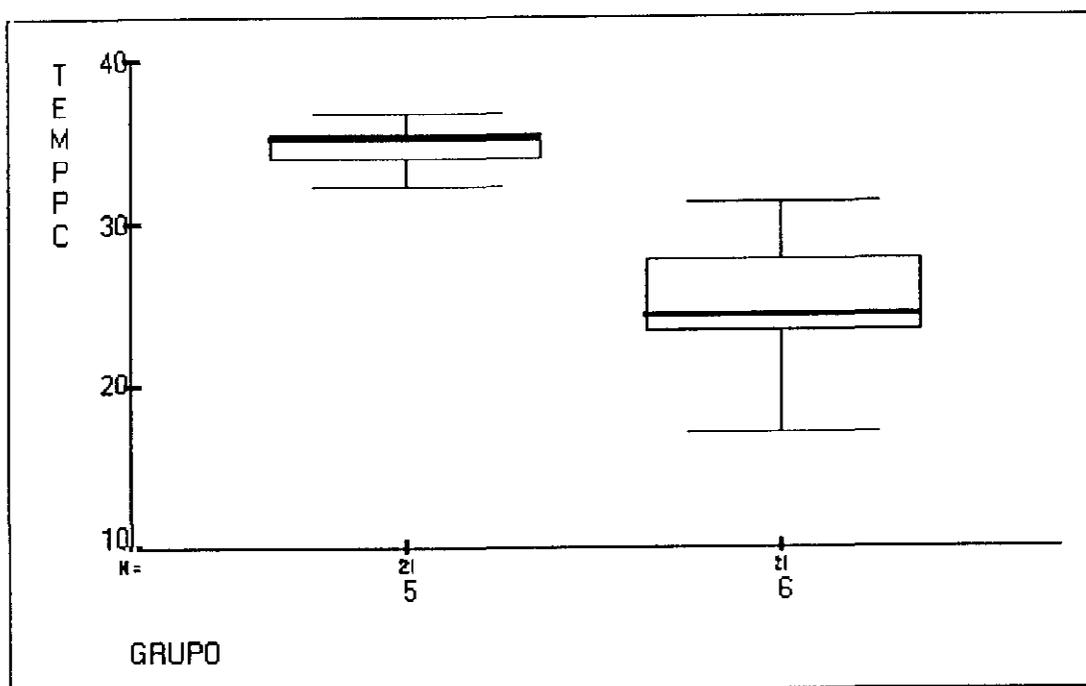
Respecto a las variables secundarias a controlar, fueron todas analizadas por la U de Mann-Whitney dada la citada inhomogeneidad de varianzas, y en ningún caso hubo diferencias significativas entre los grupos: al tener una distribución homogénea entre los grupos no era probable que contaminaran el experimento. Las enumeramos a continuación al lado de su nivel de significación p que en ningún caso es inferior a 0,05: ATRO100: $p=0,939$; HBF: $p=0,626$; DIAC100: $p=0,593$; KETA100: $p=0,572$; PESO: $p=0,425$.

D.2.1 EXAMEN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Se muestra a continuación mediante gráficos de caja y tablas la distribución de la variable independiente (temperatura), con el fin de comprobar si esta variable es distinta en los grupos normotérmico e hipotérmico, y por lo tanto éstos están bien caracterizados. Como veremos, las temperaturas cerebrales en el grupo de hipotermia son aproximadamente 10 °C inferiores a los del grupo de normotermia. Por otra parte, el grupo de normotermia tiene temperaturas cerebrales inferiores a las rectales en algo más de dos grados, debido probablemente a pérdidas de calor por la craneotomía (BUSTO, 1987).

Variable TEMPPC (temperatura cerebral ponderada en el tiempo):

En el **Gráfico 4** a continuación, se ve que los grupos están bien caracterizados, teniendo el **grupo 5 de normotermia** un temperatura cerebral ponderada en el tiempo mayor que el **grupo 6 de hipotermia**. No había en este caso homogeneidad de varianzas (test de Levene $p=0,004$), por lo que se utilizó la prueba U de Mann-Whitney que muestra diferencias significativas entre los dos grupos, con unos niveles de significación de $p < 0,001$ (**Tabla 29**).



Gráfica 4

Tabla 29. Diferenciación de los dos grupos por la temperatura cerebral media ponderada en el tiempo (TEMPPC).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	34,77	1,515	Z = -5,547
6-HIPOTERMIA	21	25,09	3,426	p < 0,001

Variable TEMPMC (temperatura cerebral, media aritmética):

Tampoco en éste caso la varianza era homogénea (test de Levene F= 6,41 p= 0,015) por lo que se utilizó la U de Mann-Whitney.

La temperatura media cerebral (TEMPMC) diferencia los dos grupos claramente, lo cual es visible en el **Gráfico 5** a continuación y se confirma una diferencia estadísticamente significativa en la **Tabla 30**.

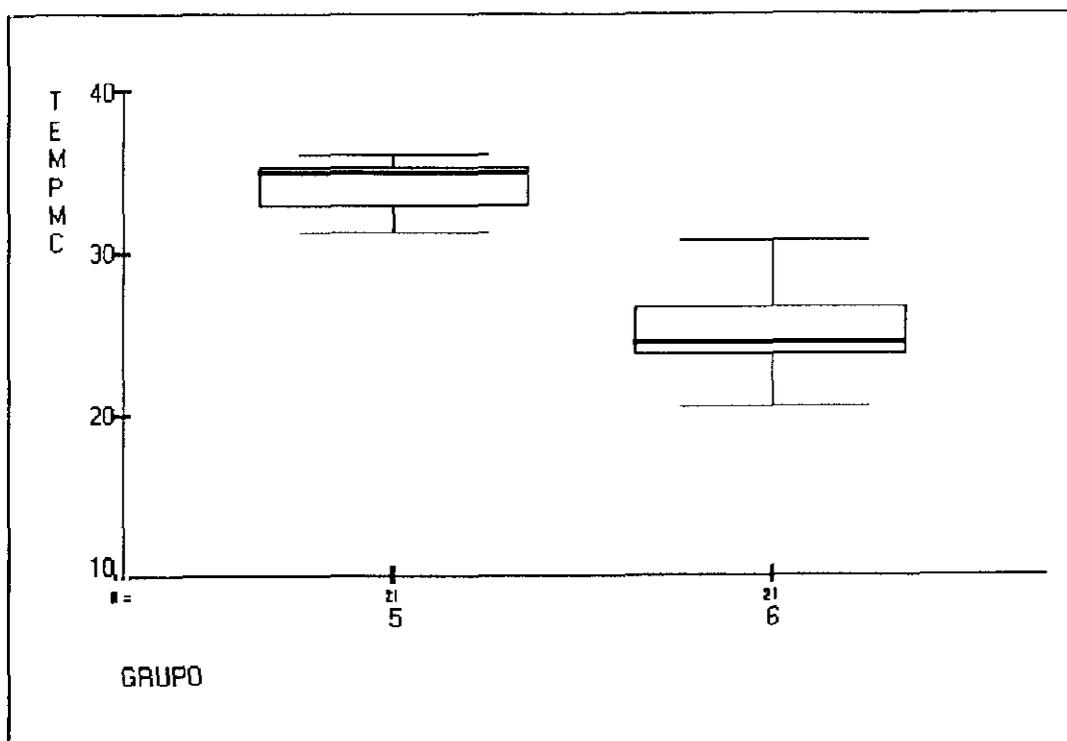


Gráfico 5

Tabla 30. Diferenciación de los dos grupos por la temperatura cerebral media(TEMPMC).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	34,300	0,299	Z = -5,546
6-HIPOTERMIA	21	25,199	0,548	p < 0,001

Variable TEMPPR (temperatura rectal ponderada en el tiempo):

También en éste caso se utilizó la U de Mann-Whitney por no haber homogeneidad de varianzas (test de Levene $F = 11,23$; $p = 0,002$), el cual muestra diferencias significativas entre los grupos (Tabla 31).

En el Gráfico 6 a continuación, aunque los grupos son claramente diferentes respecto a la temperatura rectal ponderada en el tiempo, hay alguna superposición de valores, lo que no consideramos invalide la caracterización de los grupos, ya que ésta se ha hecho en base a la temperatura cerebral, que es la variable más relevante en el experimento.

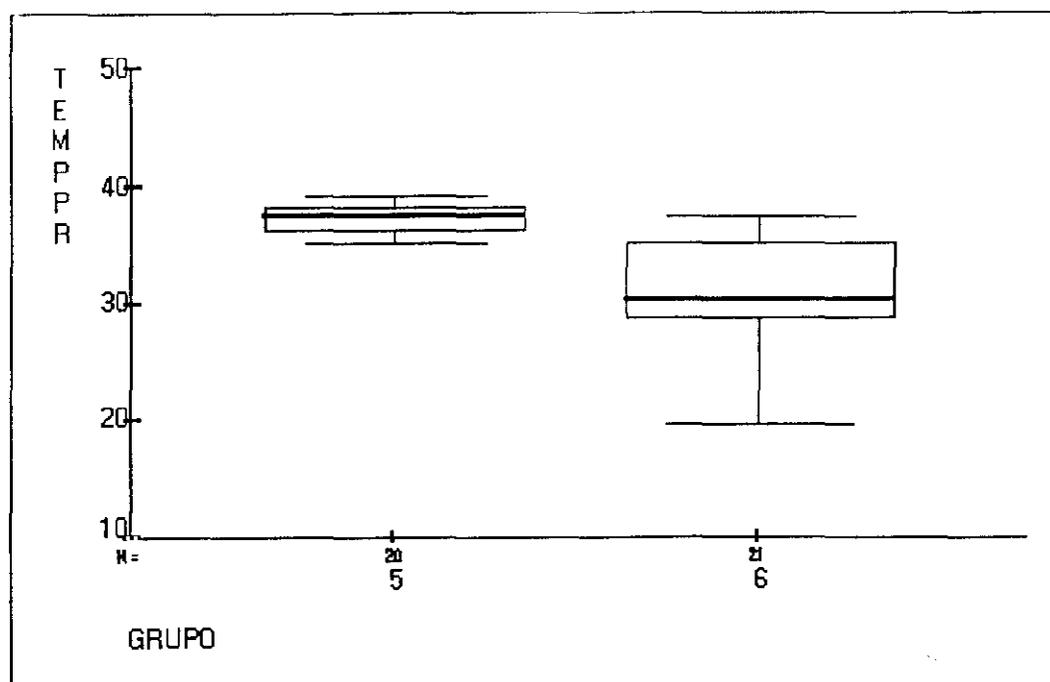
**Gráfica 6**

Tabla 31. Diferenciación de los dos grupos por la temperatura rectal ponderada en el tiempo (TEMPPR).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	37,116	0,386	Z = -4,603
6-HIPOTERMIA	21	30,537	1,098	p < 0,001

Variable TEMPMPR (temperatura rectal media).

Como en el caso anterior, los dos grupos se diferencian claramente tanto en el **Gráfico 7** a continuación, como en la tabla estadística (**Tabla 32** con estadígrafo de la U de Mann-Whitney al no ser la varianza homogénea, pues el test de Levene arrojó una F de 10,63 con $p = 0,02$). También existe alguna superposición de temperaturas rectales medias en el gráfico que no invalida la caracterización, que se hace fundamentalmente a partir de las temperaturas cerebrales, más relevantes en nuestro experimento.

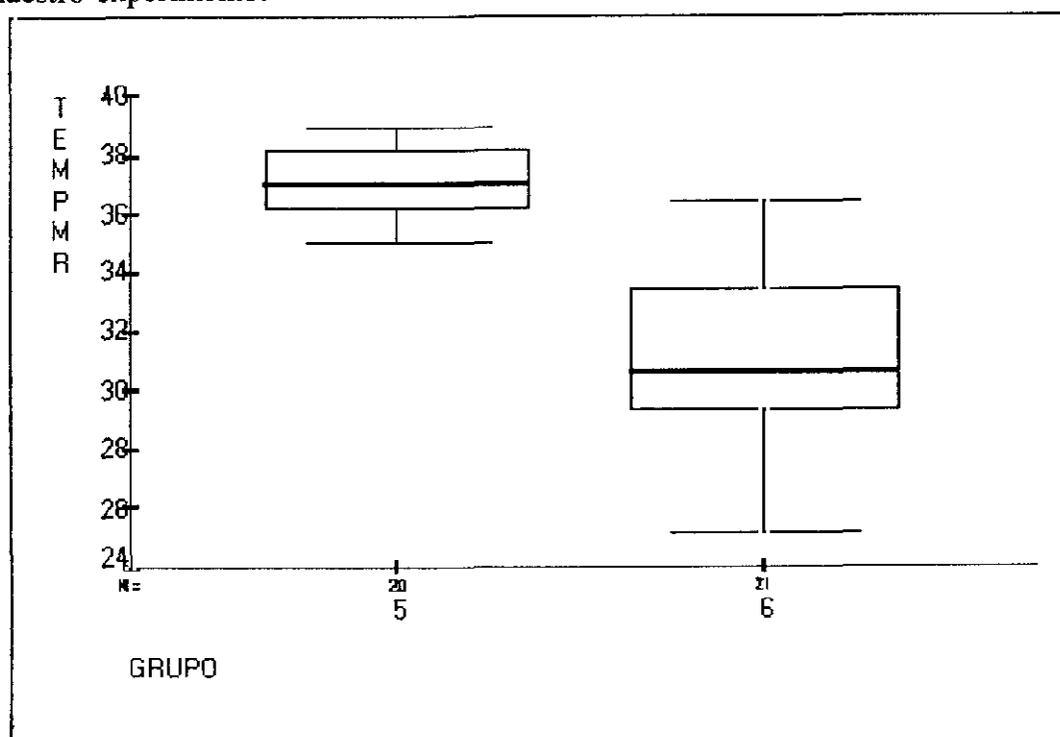


Gráfico 7

Tabla 32. Diferenciación de los dos grupos por la temperatura rectal media (TEMPMR).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	37,038	0,381	Z= -4,955
6-HIPOTERMIA	21	31,254	0,705	p=0,000

Como hemos visto para las temperaturas rectales (TEMPPR y TEMPMR), el grupo de normotermia tenía una temperatura aproximada de 37 °C, mientras que en el de hipotermia era inferior en algo más de seis grados. Por lo tanto, la reducción de temperatura fue más intensa en el cerebro (10 °C) que en el resto del organismo.

MORTALIDAD.

Aunque es claramente mayor la mortalidad entre el grupo de normotermia, las diferencias no alcanzaron significación estadística, probablemente debido al tamaño de la muestra.

Tabla 33. Diferenciación de los dos grupos por la mortalidad.

GRUPO	N	MUERTES	PORCENTAJE	Chi ² =2,67 (Corrección de Yates)
5-NORMOTERMIA	21	4	19,042	p= 0,1021
6-HIPOTERMIA	21	0	0	(n. s.)

D.2.3 TEST t DE COMPARACION DE MEDIAS.

El siguiente paso, que debía constituir la parte principal del experimento, fue practicar un contraste de medias, que para el caso de dos grupos como el que teníamos planteado (normotermia, hipotermia), podía llevarse a cabo con el test de la t de Student. Así pues enfrentaríamos las medias conseguidas por cada uno de los dos grupos en cada una de las variables dependientes. En los casos referidos en los que la distribución de las variables dependientes no era normal (VOLPIGB, VOLTIGB) o no existía homogeneidad de varianzas (VOLIPPOS, VOLIPRES, VOLTOI, VOLPIGB, VOLTIGB), se utilizó la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney.

No mostraron diferencias significativas las variables VOLVENT, VOLTCP, VOLART. Todas ellas eran variables secundarias a controlar, por lo que su distribución homogénea en los dos grupos hacía esperar que no contaminarían los resultados del experimento.

En las siguientes tablas (Tablas 34-42) se muestran las variables dependientes en las que sí había una diferencia significativa entre los dos grupos.

Tabla 34. -- Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen de infarto proporcional (VOLPROI).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
5-NORMOTERMIA	21	12,162	1,519	t = 3,20
6-HIPOTERMIA	21	6,320	1,011	p = 0,003

Tabla 35. *Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen total de infarto (VOLTOI).*

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	119,969	70,026	Z = -4,955
6-HIPOTERMIA	21	60,984	43,670	p < 0,001

(El test de Levene mostró una $F = 4,256$ y $p = 0,046$ por lo que requirió un test no paramétrico).

El volumen de infarto proporcional al volumen total, que es la variable dependiente que consideramos más relevante, es significativamente menor en el grupo de hipotermia que en el grupo de normotermia.

Esta diferencia se mantiene en las variables dependientes que excluyen variables secundarias que podrían contaminar el experimento. De esta manera, volviendo a calcular el volumen proporcional de infarto tras excluir del volumen cerebral total el artefacto (VOLPROI-A), el volumen ventricular (VOLPROI-V) o la suma de ambos (VOLPROI-VA), se mantienen las diferencias entre ambos grupos, como se ve en las tres tablas siguientes:

Tabla 36. *Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen de infarto proporcional excluyendo el artefacto (VOLPROI-A).*

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
5-NORMOTERMIA	21	12,188	1,525	t = 3,19
6-HIPOTERMIA	21	6,348	1,018	p = 0,003

Tabla 37. *Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen de infarto proporcional excluyendo los ventrículos (VOLPROI-V).*

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
5-NORMOTERMIA	21	12,40	1,552	t = 3,20
6-HIPOTERMIA	21	6,432	1,035	p = 0,003

Tabla 38. *Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen de infarto proporcional excluyendo el artefacto y los ventrículos (VOLPROI-VA).*

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
5-NORMOTERMIA	21	12,440	7,177	t = 3,20
6-HIPOTERMIA	21	6,460	4,773	p = 0,003

Si se tiene en cuenta solo el volumen de infarto cortical, se mantienen las diferencias significativas, siendo diferente entre los dos grupos tanto el volumen de infarto cortical total (VOLTICOR), como el proporcional (VOLPICOR), como vemos en las dos tablas siguientes.

Tabla 39. *Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen proporcional de infarto cortical (VOLPICOR).*

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
5-NORMOTERMIA	21	10,786	1,287	t = 3,045
6-HIPOTERMIA	21	5,962	0,926	p = 0,004

Tabla 40. Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen total de infarto cortical (VOLTICOR).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	CONTRASTE
5-NORMOTERMIA	21	106,126	12,759	t= 3,14
6-HIPOTERMIA	21	57,567	8,735	p=0,003

También el volumen total como el proporcional de infarto que afecta a los ganglios basales son significativamente mayores en el grupo normotérmico que en el hipotérmico, como se constata en las dos tablas siguientes. En estas dos variables (VOLPIGB, VOLTIGB), es necesario realizar test no paramétricos tanto por no tener una distribución normal como por no tener varianzas homogéneas (test de Levene con $F= 18,31$; $p < 0,001$ para VOLPIGB, y con $F= 19,0006$ y $p < 0,001$ para VOLTIGB).

Tabla 41. Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen proporcional de infarto en los ganglios basales (VOLPIGB).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	1,373	1,669	Z= -2,482
6-HIPOTERMIA	21	0,331	0,720	p=0,0131

Tabla 42. Diferencia significativa entre los grupos respecto al volumen total de infarto de ganglios basales (VOLTIGB).

GRUPO	N	MEDIA	ERROR ESTANDAR	U Mann-Whitney
5-NORMOTERMIA	21	14,039	3,741	Z=-2,363
6-HIPOTERMIA	21	3,344	1,506	p=0,0181

E. DISCUSSION.

E. DISCUSION

E.1 DISCUSION DEL EXPERIMENTO SOBRE GLUCEMIA E INFARTO CEREBRAL.

El objetivo del estudio era el averiguar si los distintos grados de glucemia influían en la extensión del infarto cerebral en la rata, y si el momento en que se modificaba la glucemia podía determinar diferentes volúmenes de infarto cerebral. Por ello, como se estableció en el apartado de MATERIAL Y METODOS, se habían hecho cuatro grupos de animales que eran homogéneos excepto por el nivel de glucemia y el momento en que se modificaba: **Grupo 1: Hiperglucemia; Grupo 2: Normoglucemia; Grupo 3: Hipoglucemia posterior a la isquemia cerebral; Grupo 4: Hipoglucemia previa al inicio de la isquemia.** Como se especificó en MATERIAL Y METODOS, en los tres primeros grupos las modificaciones de glucemia se realizaban dos horas tras la cirugía, mientras que en el cuarto se hacía inmediatamente antes del comienzo de la misma.

La variable dependiente más relevante era el volumen de infarto cerebral. Pero, como vimos en el apartado de RESULTADOS, el volumen cerebral no era homogéneo entre los diferentes grupos, por lo que además del volumen cerebral total de infarto (variable VOTOI), se calculó el volumen cerebral de infarto proporcional al volumen cerebral total (variable VOLPROI), que corrige las diferencias que pudiera haber entre los volúmenes cerebrales totales de los diferentes grupos.

Como puede observarse en el apartado de RESULTADOS (Tablas 8-11), tanto el volumen total de infarto como el volumen proporcional de infarto, son significativamente menores en el **grupo 4 de Hipoglucemia previa** que en los **grupos 1 de Hiperglucemia y el grupo 3 de Hipoglucemia posterior al infarto.**

El volumen de infarto del **grupo 4 de Hipoglucemia previa** es la mitad que en el **grupo de 2 de Normoglucemia.** La diferencia no llega a ser estadísticamente significativa, probablemente por un bajo número de sujetos. Aunque no puede descartarse que la causa de ésta diferencia sea el azar, una diferencia tan apreciable respecto al grupo normoglucémico de referencia sugiere que la hipoglucemia previa,

que es el grupo con menor infarto cerebral tiene una acción protectora.

Por el contrario, los **grupos 1 y 3 (Hiperglucemia e Hipoglucemia posterior al infarto)** que son los que tienen un mayor volumen de infarto cerebral, (que es como hemos dicho significativamente mayor que el infarto del **grupo 4 de Hipoglucemia previa**), parecen aumentar la extensión del infarto cerebral.

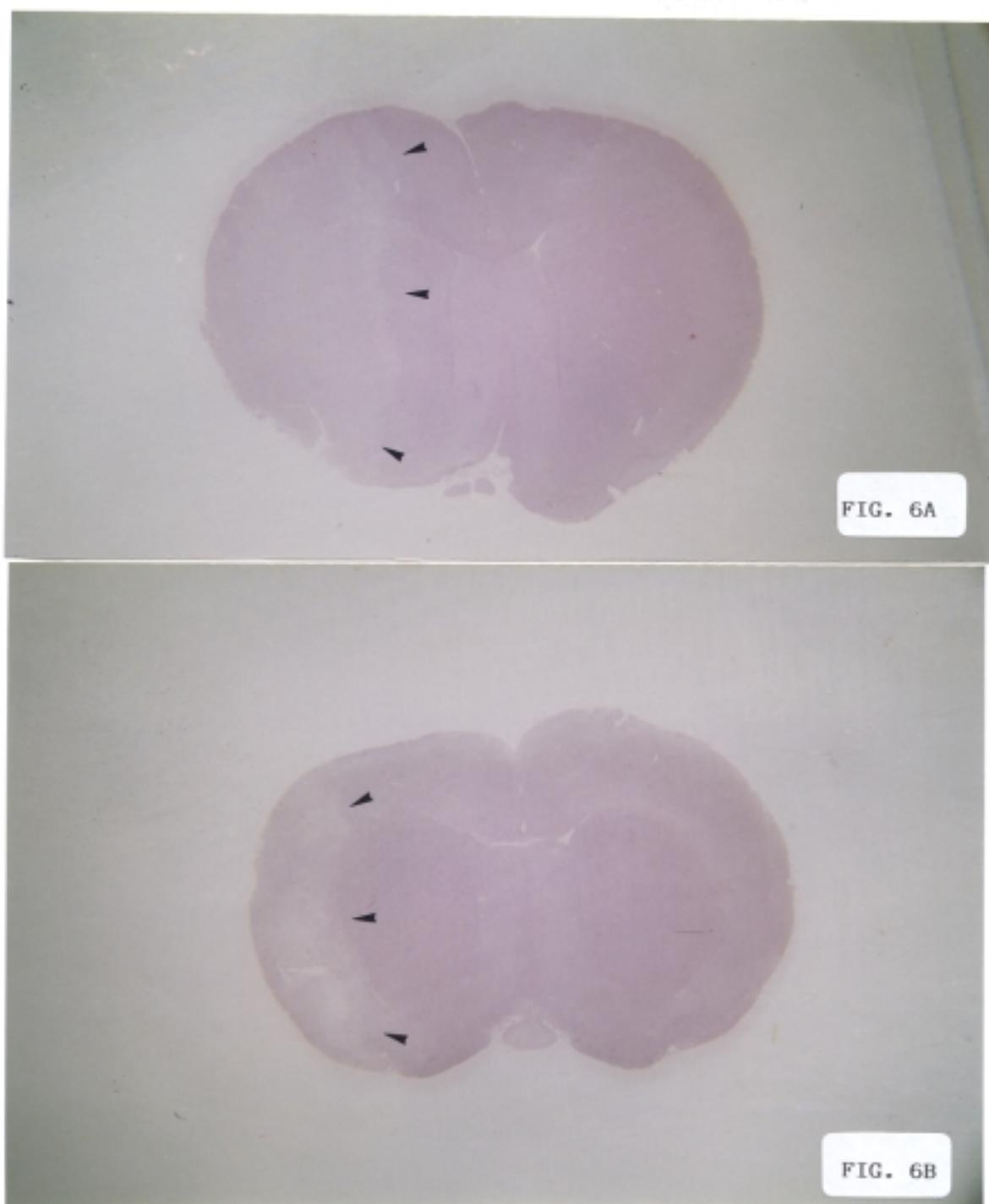
Consideraremos a continuación las diferencias de volúmenes de infarto que hay entre los distintos grupos, comentando los hallazgos coincidentes y discrepantes de otros autores.

a) Hipoglucemia previa-hiperglucemia (grupo 1 - grupo 4):

Como comentamos en el apartado de **INTRODUCCION**, existen bastantes estudios coincidentes en el papel dañino de la hiperglucemia en modelos de isquemia global y aunque en menor número, también en modelos de isquemia focal, pero algunos autores no encuentran una acción perjudicial en hiperglucemia, e incluso la consideran beneficiosa. Por ello incluimos un grupo de hiperglucemia en nuestro experimento.

Nuestros resultados sugieren la existencia de un papel dañino para la hiperglucemia y de una función protectora para la hipoglucemia que se instaura antes del infarto. En la sección de **RESULTADOS (Tablas 9 y 11)** se muestra que mientras que el **grupo 4 de Hipoglucemia previa** al infarto tiene un volumen total de infarto de 47,594 mm³ y un volumen proporcional de infarto sobre el volumen cerebral total de 4,740 el **grupo 1 de Hiperglucemia** tiene un volumen total de infarto de 144,441 mm³ y un volumen proporcional de infarto de 11,147 siendo todas las diferencias significativas en el test de comparación múltiple de medias de Student-Neumann-Keuls, con una $p < 0,05$. En concreto, el volumen de infarto en el grupo 4 fue aproximadamente un tercio del del grupo 1.

En la **Figura 6A** podemos ver un cerebro correspondiente al **grupo 1**, mientras que la figura **6B** corresponde a un cerebro del **grupo 4**.



Figuras 6A y 6B. Cortes coronales de cerebro de rata hiperglucémica (**figura 6A**) y de rata con hipoglucemia previa al infarto (**figura 6B**). El área de infarto aparece más pálida que el resto del cerebro. Las cabezas de flecha señalan el borde medial del infarto. Tinción con hematoxilina-eosina.

La ausencia de una correlación lineal significativa entre la glucemia y el volumen de infarto cerebral hace pensar que no existe una relación lineal entre las modificaciones de la glucemia y los volúmenes de infarto cerebral, pero no excluye una relación de otro tipo. Ello no es muy sorprendente si tenemos en cuenta que una mismo descenso de 50 mgrs/dl provoca graves consecuencias en el metabolismo celular y en el estado clínico de 70 a 20 mgrs/dl y en cambio un descenso de 120 a 70 mgrs/dl casi no tiene repercusión.

Nos planteamos si las diferencias halladas podrían explicarse por un mayor volumen de los ventrículos, un mayor volumen de artefacto por pequeño que fuera (cuando se producía, y aunque siempre fue menor que el 1% del volumen cerebral) o por la suma de ambos que afectara de forma diferente a alguno de los grupos experimentales. Dado que no existían diferencias significativas entre estas variables secundarias, como hemos referido en la sección de **RESULTADOS (Tablas 12 - 18)**, no era probable que contaminaran el experimento. Para mayor seguridad, volvimos a calcular la variable dependiente principal, (el volumen de infarto proporcional al volumen cerebral total, VOLPROI) restando del volumen cerebral total el volumen ventricular (VOLPROI-V), el volumen de artefacto (VOLPROI-A), y ambos (VOLPROI-VA). Como hemos visto en la sección de **RESULTADOS**, se mantienen las diferencias significativas entre los grupos.

Desde los trabajos pioneros de MYERS y YAMAGUCHI (MYERS, 1977), que observaron que los monos hiperglucémicos sometidos a una breve parada cardiaca tenían un mayor daño neurológico que los normoglucémicos, son muchos los trabajos que han confirmado que la hiperglucemia empeora el daño cerebral en animales sometidos a isquemia cerebral global transitoria (LJUNGGREN, 1974; SIEMKOWICZ, 1978; GINSBERG, 1980; PULSINELLI, 1982a; VAZQUEZ CRUZ, 1990b).

Sin embargo en modelos de isquemia focal como el que hemos utilizado, (cuyo equivalente en seres humanos es el AVC), las opiniones no han sido unánimes aunque la mayoría encuentra, como nosotros, que la hiperglucemia aumenta el volumen de infarto cerebral (NEDERGAARD, 1986a; NEDERGAARD, 1987b; NEDERGAARD, 1987c; DE COURTEN-MYERS, 1988; DE COURTEN-MYERS,

1989; DUVERGER, 1988; YIP, 1991).

Un pequeño número de autores ha encontrado reducciones del volumen de infarto (GINSBERG, 1987), pero éstos estudios, realizados en el gato y el conejo, comparan en realidad diferentes grados de hiperglucemia, pues también los grupos controles, aunque en menor grado, tenían la glucemia aumentada (ZASSLOW, 1989; KRAFT, 1990).

En clínica humana no se ha estudiado la hipoglucemia en el infarto cerebral, pero sí la hiperglucemia. Hasta hace poco se intentaba controlar la diabetes mellitus y la hiperglucemia crónica como un factor de riesgo vascular más y por tanto predisponente a los accidentes cerebrovasculares. Actualmente los trabajos en el hombre han confirmado el papel deteriorante de la hiperglucemia en la fase aguda del ictus. Esto es importante, pues casi la tercera parte de los ictus se acompañan de hiperglucemia. En efecto, tanto si la hiperglucemia se debe a una diabetes mellitus como si no, aumenta la extensión del infarto cerebral y la mortalidad (PEINADO, 1984; GRAY, 1989; KIERS, 1992) y empeora el pronóstico (GIROUD, 1987). Incluso hiperglucemias leves como las iguales o superiores a 120 mgrs/dl. duplican las probabilidades de morir o quedar con graves secuelas tras un ACV (PULSINELLI, 1983c). El infarto cerebral progresivo en seres humanos (DAVALOS, 1990) y en el gerbo (VAZQUEZ CRUZ, 1990a) se ha asociado a hiperglucemia.

Aunque en algunos trabajos no se ha encontrado que la hiperglucemia empeore el pronóstico del accidente cerebrovascular humano (CAMBON, 1991; MATCHAR, 1992; DEROUSNE, 1993), los estudios experimentales y clínicos que avalan el papel perjudicial de la hiperglucemia en los ictus son mayoritarios, lo que ha tenido ya consecuencias prácticas en el manejo de los enfermos con accidentes cerebrovasculares. Por este motivo, actualmente se tiende a no alimentar precozmente a dichos enfermos y no se les administran soluciones glucosadas en los primeros momentos.

Como revisamos en el apartado A.4.7 de la INTRODUCCION, resulta más controvertido el origen de la hiperglucemia en los accidentes cerebrovasculares en

seres humanos que su acción dañina (KIERS, 1992; MURROS, 1992). Algunos consideran lesiva una diabetes subyacente más que la hiperglucemia en sí (TOPIC, 1989), mientras que otros opinan que es la hiperglucemia que acompaña al ictus la responsable del mayor daño cerebral (HELGASON, 1987). La diabetes mellitus puede empeorar el infarto por su acción sobre la microvasculatura, disminuyendo la autorregulación, aumentando la viscosidad plasmática y la adherencia de los leucocitos al endotelio, y haciendo que los eritrocitos sean menos deformables.

Existen muchas diferencias entre los pacientes que desarrollan un AVC y un modelo con animales que no son diabéticos y sometidos a cirugía craneal, por lo que no podemos extrapolar directamente nuestros resultados a la clínica humana. Sin embargo, los datos que hemos obtenidos con hiperglucemia aguda indican que la existencia previa de una diabetes mellitus con sus consecuencias vasculares no es necesaria (aunque pueda contribuir) para aumentar el tamaño del infarto cerebral, pues la hiperglucemia aguda en sí aumenta el tamaño de infarto.

Otra cuestión muy debatida es si la hiperglucemia aguda es la causa del empeoramiento del ictus, o se trata de una respuesta de estrés proporcional a la gravedad del infarto (WOO, 1988) y por tanto la consecuencia del mismo. En nuestro experimento modificamos la glucemia a grupos en las mismas condiciones ambientales y operados con la misma técnica quirúrgica. Encontramos mayores volúmenes de infarto en los animales en los que se provocó hiperglucemia, y dado que el grado de estrés fue similar, se puede afirmar en este modelo que la hiperglucemia es la causa y no la consecuencia de un mayor volumen de infarto cerebral.

También constatamos que se produce una respuesta hiperglucémica de estrés en las ratas, pues existían ligeras hiperglucemias en la medición inicial, cuando sólo se habían cateterizado los vasos, antes de la cirugía craneal y de la infusión de glucosa o insulina. Tras la cirugía la hiperglucemia era más marcada por lo que en todos los casos en que se quiso producir normo o hipoglucemia fue necesaria la infusión de insulina. Como administramos glucosa o/y insulina a los diferentes grupos experimentales modificando la respuesta de estrés, no hemos podido estudiar la influencia de dicha respuesta en el tamaño del infarto.

El mecanismo por el que la hiperglucemia empeoraría el infarto cerebral es discutido. Como se ha comentado en la INTRODUCCION, el metabolismo anaerobio de la glucosa genera ácido láctico y una gran proporción de autores señalan a la acidosis láctica ocasionada por la hiperglucemia como el principal culpable. Así, el infundir glucosa o alimentar a un animal experimental en condiciones de isquemia, puede elevar los niveles de ácido láctico hasta 30 $\mu\text{mol/gr}$ en el tejido isquémico, siendo cifras por encima de 20-25 $\mu\text{mol/gr}$ tóxicas para las neuronas (REHNCRONA, 1981; SIESJÖ, 1985). En otros experimentos, niveles de ácido láctico por encima de 16 $\mu\text{mol/gr}$ hacen que una necrosis neuronal selectiva se transforme en infarto, con muerte de todos los tipos celulares (neuronas, glía, células endoteliales) (PLUM, 1982).

Estudios bioquímicos han mostrado que a pesar del mayor daño histológico, en la hiperglucemia se han encontrado mayores concentraciones de ATP y fosfocreatina, es decir, un estado energético mejor conservado que en normoglucemia, lo que parece deberse al metabolismo anaerobio de esa mayor cantidad de sustrato, pero la producción de energía se hace a costa de una mayor concentración de ácido láctico (FOLBERGROVA, 1992). Esta acidosis láctica podría ser responsable de una menor reperfusion, del descenso del flujo cerebral y de una disminución en la utilización de oxígeno para el metabolismo de la glucosa en el área de infarto en situación de hiperglucemia (SIEMKOWICZ, 1982) respecto a la normoglucemia. De hecho, con similares reducciones del flujo cerebral, el pH disminuye más en hiper que en normoglucemia. Respecto a la acidosis provocada por hiperglucemia, en la hiperglucemia aguda experimental la recuperación del pH bajo es más lenta que en la crónica en situación de isquemia global (SIEBER, 1994).

A diferencia de lo que ocurre en la acidosis láctica, la acidosis respiratoria aislada no produce apenas daño neuronal si no se acompaña de fallo energético (PALJARVI, 1982) y de una mayor rotura de la barrera hematoencefálica (esto último se mide por la mayor extravasación de la peroxidasa de rábano) (DIETRICH, 1993). El daño a la barrera hematoencefálica puede ser otro mecanismo lesivo de la hiperglucemia, pues se ha comprobado en ratas que sufren isquemia en condiciones de hiperglucemia, un mayor contenido en agua y edema cerebral por estar más lesionada la barrera hematoencefálica (PULSINELLI, 1982a; WARNER, 1987).

La hiperglucemia aumenta la susceptibilidad de las células a la isquemia: en experimentos de isquemia global, el daño restringido a algunas neuronas selectivamente vulnerables que se produce en animales normoglucémicos, se extiende en condiciones de hiperglucemia a todas las neuronas, a la glía y se acompaña de edema cerebral. Esto sucede si la hiperglucemia es anterior o simultánea a la isquemia, pero no si es posterior, dado que el tejido isquémico no recibe el exceso de glucosa. Por este motivo la isquemia parcial o transitoria (con reperusión) puede ser más dañina que la completa, pues aporta un exceso de glucosa que no puede ser oxidado por las mitocondrias y es metabolizado anaerómicamente, aumentando los niveles de ácido láctico.

Como hemos revisado, son mayoría los autores que encuentran como nosotros un aumento del daño cerebral isquémico con la hiperglucemia. Aunque se ha estudiado menos, también existen autores con los que coincidimos, que encuentran una función protectora a la hipoglucemia.

La normalización de la glucemia por medio de la insulina en modelos de isquemia global, ha mostrado una reducción del volumen de infarto tanto en hiperglucemias agudas provocadas por infusión de glucosa, como es el caso de nuestro experimento, como en hiperglucemias crónicas en ratas hechas diabéticas por medio de la estreptozocina (WARNER, 1992).

También se ha encontrado que la hipoglucemia puede ser beneficiosa, al evitar la acidosis láctica que la hiperglucemia ocasiona. De esta manera, el daño por la isquemia de las mitocondrias podría no ser irreversible, al no añadirse el daño por acidosis láctica, y podrían volver a funcionar. En este sentido se ha encontrado una mejoría de la función mitocondrial, medida por el consumo cerebral de oxígeno, cuando tras la isquemia hiperglucémica se añade insulina (SIEMKOWICZ, 1982). En pacientes vivos con accidente cerebrovascular se ha comprobado mediante espectroscopia por resonancia magnética que la hipoglucemia previene en parte el aumento de ácido láctico (ROSENBERG, 1991). Otros estudios han encontrado en animales una mejor recuperación de la fisiología de la médula espinal isquémica con la hipoglucemia (ROBERTSON, 1987). Respecto al aprendizaje, las ratas sujetas a isquemia transitoria olvidan un laberinto aprendido, que mide la memoria de trabajo

mediada por el hipocampo, pero si se las somete a hipoglucemia leve, existe una protección cognitiva, pues realizan la tarea igual que los controles (STRONG, 1990).

No hay que olvidar que la insulina, además de modificar la glucemia, también puede tener una acción protectora directa, dado que existen receptores a la misma distribuidos por todo el sistema nervioso central (PACOLD, 1979). No se conocen todos los efectos de la insulina en el cerebro, aunque se sabe que modula la conducta de alimentación en el hipotálamo (OOMURA, 1981), y que regula la liberación de norepinefrina hipotalámica, por lo que puede jugar un papel en la neurotransmisión: las catecolaminas, tanto a nivel de sistema nervioso central (BLOMQUIST, 1985) como periférico (KOIDE, 1986), pueden aminorar el daño isquémico.

El sustituir calorías procedentes de los hidratos de carbono por calorías procedentes de otros sustratos ha mejorado el infarto cerebral experimental, lo que podría llevar a cambiar en este sentido la dieta de los enfermos con ACV (ROBERTSON, 1992).

Es conocido que el metabolismo de la glucosa es distinto en diferentes áreas de la corteza cerebral, por lo que en el cerebro podrían lesionarse de forma preferente algunas zonas dentro de la distribución de la arteria cerebral media ocluida. Para ello (Tablas 19-22 de la sección de RESULTADOS) calculamos el porcentaje de infarto que se encuentra por delante (variable VOLIPRES) y por detrás de la cisura de Rolando (variable VOLIPOS) en los grupos entre los que habíamos encontrado diferencias significativas. Dicha cisura en la rata se encuentra, en sentido anteroposterior, aproximadamente en el punto medio de la corteza. Como vimos en la sección de RESULTADOS, mientras que en el **grupo 4 de Hipoglucemia previa** una mayor proporción de infarto se localiza anterior a la cisura de Rolando, en los **grupos 3 de Hipoglucemia posterior al infarto y grupo 1 de Hiperglucemia** sucede lo contrario. Aparentemente, la mayor protección por hipoglucemia previa se produjo posterior a la cisura de Rolando.

Como hemos visto en la sección de INTRODUCCION, el metabolismo del exceso de glucosa que se produce en la hiperglucemia se hace en condiciones

anaerobias y cada molécula de glucosa sólo produce dos moléculas de ATP (en cambio se producen 36-38 por metabolismo aerobio), acumulándose ácido láctico y iones H^+ . Por ello, un mayor aporte de glucosa si la reperfusión es en condiciones de hiperglucemia, no sólo aumenta el daño histológico, sino que como se ha visto en modelos de isquemia global, impide la recuperación del estado energético y disminuye la actividad electrocortical (REHNCRONA, 1981) y la propia reperfusión (VENABLES, 1985). Este mecanismo justificaría que la hiperglucemia tras la oclusión vascular agravase el daño de áreas cerebrales con circulación colateral como la corteza, sin influir en zonas arteriales terminales como los ganglios basales (PRADO, 1987) cuyo equivalente en enfermos con ACV serían los infartos lacunares. En el mismo sentido de un mayor daño a las zonas reperfundidas está el hallazgo de que las zonas que recuperan el consumo de glucosa pero mantienen el flujo sanguíneo disminuido, son las que sufren mayor daño histológico (GINSBERG, 1985).

Para estudiar el efecto de las diferentes condiciones experimentales sobre los ganglios basales, se midieron por separado el volumen de corteza cerebral y el de los ganglios basales, con sus correspondientes infartos. Además de recibir vascularización diferente, se trata de poblaciones neuronales distintas y que por lo tanto pueden tener diferentes susceptibilidades a las modificaciones de la glucemia que caracterizaban los grupos.

En las Tablas 23 y 24 de la sección de **RESULTADOS**, los volúmenes total (VOLTIGB) y proporcional a todo el cerebro de infarto de ganglios basales (VOLPIGB) en el **grupo 1 de Hiperglucemia** son de $30,327 \pm 6,054 \text{ mm}^3$ y de $2,375 \pm 0,476$ respectivamente, mientras que en el **grupo 4 de Hipoglucemia previa** son de $0,802 \pm 0,580 \text{ mm}^3$ y $0,074 \pm 0,051$, diferencias que tienen significación estadística en el test de la U de Mann-Whitney. Ello indica que estas dos situaciones sí influyen la lesión de los ganglios basales. Ello es lo esperable, pues al ser la hipoglucemia previa a la oclusión vascular, el contenido en glucosa de los mismos está reducido al inicio de la isquemia, lo que condiciona las reacciones metabólicas posteriores.

Por el contrario, en el **grupo 3 de Hipoglucemia posterior a la oclusión**

vascular, el volumen de infarto de ganglios basales total ($32,492 \pm 6,408 \text{ mm}^3$) y proporcional ($2,370 \pm 0,441$) no difiere significativamente del encontrado en el **grupo 1 de Hiperglucemia**. También son éstos resultados previsibles, pues al modificarse en ambos la glucemia después de la oclusión vascular, no pueden repercutir sobre los ganglios basales, que no tienen circulación colateral.

Algunos autores sugieren que más que la hiperglucemia, el factor deteriorante podría ser el aumento del hematocrito (con el consiguiente aumento de viscosidad y disminución del flujo cerebral) que puede producir la glucosa hipertónica parenteral (HILLBOM, 1984). Ello se excluyó en nuestro estudio, al haber controlado dicha variable y no existir diferencias significativas en la hemoglobina inicial, en la final ni en la variación de la hemoglobina entre el inicio y el final del experimento. En otros estudios, un aumento de la osmolaridad por medio del manitol, no ha aumentado el daño cerebral, pero sí lo ha hecho la hiperglucemia (PULSINELLI, 1982a).

b) Hipoglucemia previa (grupo 4) - Normoglucemia (grupo 2):

El volumen proporcional de infarto (VOLPROI), la variable dependiente que hemos considerado principal, no difiere estadísticamente entre el **grupo 4 de Hipoglucemia previa** y el **grupo 2 de Normoglucemia**, por lo que no puede afirmarse que una de las dos situaciones sea mejor para el cerebro isquémico.

Sin embargo, (Tablas 6 y 7) dicho volumen fue casi el doble ($8,68 \pm 6,48$) en normoglucemia que en hipoglucemia previa ($4,74 \pm 4,69$). También el volumen total de infarto cerebral es el doble en normoglucemia ($103,49 \pm 93,28 \text{ mm}^3$) que en hipoglucemia previa a la oclusión vascular ($47,59 \pm 50,51 \text{ mm}^3$). La ausencia de significación estadística pudiera deberse a un bajo número de sujetos motivo por el cual esta cuestión debe seguir siendo estudiada.

Encontramos en los ganglios basales (variables VOLTIGB y VOLPIGB de volúmenes de infarto de ganglios basales totales y proporcionales al volumen cerebral total, Tablas 24 y 23 de la sección de RESULTADOS) que tampoco hay una diferencia significativa entre el **grupo 4 de Hipoglucemia previa**, y el **grupo**

2 de Normoglucemia, por lo que en este territorio sin circulación colateral, la hipoglucemia previa al infarto se comporta de forma similar al resto del cerebro en el que tampoco las lesiones que se producen en estas dos situaciones difieren estadísticamente.

c) Hipoglucemia previa (grupo 4) - Hipoglucemia posterior (grupo 3):

En nuestro experimento, la hipoglucemia que se provocaba antes de la oclusión vascular (**grupo 4 de Hipoglucemia previa**), ocasionó volúmenes de infarto significativamente menores que los obtenidos cuando la hipoglucemia se provocaba dos horas después del inicio del infarto (**grupo 3 de Hipoglucemia posterior**). El volumen total de infarto (VOLTOI) y volumen proporcional de infarto (VOLPROI) eran de $47,59 \pm 15,97 \text{ mm}^3$ y $4,74 \pm 1,48$ en el **grupo 4 de Hipoglucemia previa** y de $159,54 \pm 27,17 \text{ mm}^3$ y $11,93 \pm 2,15$ en el **grupo 3 de Hipoglucemia posterior al infarto** respectivamente (Tablas 8 y 10 de la sección de **RESULTADOS**).

También NERDEGAARD ha encontrado que cuando la hipoglucemia por insulina es previa a la isquemia por oclusión experimental de la arteria cerebral media (isquemia focal), se producen importantes reducciones del volumen de infarto con glucemias de 36 mg/dl aproximadamente (NERDEGAARD, 1987b), y en modelos de isquemia global con hipoglucemias de 55 mg/dl provocada administrando insulina previamente a la isquemia, se ha mostrado mejor funcionamiento cognitivo (STRONG, 1990).

Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que el ácido láctico acumulado por metabolismo anaerobio de la glucosa produce un deterioro irreversible. El descenso de las cifras de glucosa dos horas después del infarto no va a ser capaz de modificar ésta situación.

El momento de la modificación de la glucemia (antes o después de la oclusión vascular) se ha mostrado importante en otros experimentos en los que la hiperglucemia solo era dañina si se producía antes de obstruir el vaso (LE BLANC, 1994). Un motivo puede ser que después de la oclusión vascular, los cambios en la

glucosa sanguínea influyen poco en la concentración de glucosa tisular, al no llegar apenas sangre al tejido. En la misma línea está el hallazgo de que la glucemia preisquémica determina el grado en el que aumenta el ácido láctico (LJUNGGREN, 1974), que cuando sobrepasa los 20-25 mmol/Kg, hace imposible la supervivencia neuronal.

Aunque hay estudios (VOLL, 1989) en los que una hipoglucemia inmediatamente posterior a una isquemia global de 10'5 minutos de duración se asocia a un menor daño histológico, pensamos que no contradicen nuestros resultados, en primer lugar porque en ellos se trabaja con una isquemia global (no focal como en nuestro caso) y especialmente porque en ellos la hipoglucemia se produce inmediatamente después de la isquemia y no dos horas después como se hizo en nuestro experimento.

Tal vez un aspecto importante que está poco estudiado y que se ha analizado en nuestro experimento, es cuándo instaurar la hipoglucemia. Nuestros resultados indican que en este modelo, cuando la hipoglucemia se aplica antes de la isquemia es más beneficiosa que una hipoglucemia provocada dos horas después del infarto y como vimos en el apartado a), que la hiperglucemia. En el ser humano, y si se comprobara mediante los oportunos ensayos clínicos, la hipoglucemia previa a la isquemia podría ser aplicada con fines profilácticos cuando es de temer un sufrimiento cerebral por isquemia, como sucede en la cirugía cardiaca que precisa de parada, pues puede producir isquemia global. También tienen riesgo de isquemia algunas endarterectomías carotídeas y la cirugía o embolización terapéutica de vasos intracraneales (por malformaciones arteriovenosas o aneurismas). Naturalmente, debería controlarse muy bien el grado de hipoglucemia, pues la hipoglucemia severa puede de por sí lesionar el cerebro.

d) Normoglucemia (grupo 2) - Hipoglucemia posterior a la oclusión vascular (grupo 3):

Aunque no han sido significativas las diferencias entre el grupo 2 de Normoglucemia y el grupo 3 de Hipoglucemia posterior a la oclusión vascular, el volumen de infarto es más grande en el segundo grupo (Tablas 6 y 7 de la

sección de **RESULTADOS**). Mientras que en el **grupo 2 de Normoglucemia** el volumen proporcional de infarto es de $8,678 \pm 6,48$ en el **grupo 3 de Hipoglucemia posterior a la oclusión**, es de $11,936 \pm 6,09$. Por lo tanto, nuestros resultados no indican que la hipoglucemia instaurada después del infarto tengan un papel protector, sino indiferente o ligeramente deteriorante. En ausencia de significación estadística es conveniente estudiar esta cuestión con un mayor número de individuos.

En el mismo sentido que nuestros resultados, hay estudios que han encontrado un empeoramiento del daño por isquemia en la hipoglucemia intensa (FUKOAKA, 1989). Otros autores (VOLL, 1988) han encontrado un aumento de mortalidad respecto a controles cuando la hipoglucemia es intensa que no se produce cuando es leve, aunque el daño histológico isquémico en el cerebro sería menor en ambos grupos de hipoglucemia que en los controles normoglucémicos. En la zona periinfarto, la hipoglucemia puede ser perjudicial (NERDEGAARD, 1987a), pues aunque el tamaño del infarto es menor, la necrosis neuronal selectiva, especialmente en las capas II y III de la corteza, es mayor en condiciones de hipoglucemia.

No existe acuerdo en el papel desempeñado por la hipoglucemia en el infarto cerebral, en los estudios experimentales. Además no existen estudios de hipoglucemia en isquemia cerebral humana, ni siquiera en ensayos clínicos, al revés que en el caso de la hiperglucemia, donde los datos clínicos y experimentales han llevado a evitarla en todo enfermo con ictus. La mayoría de los autores se inclina a pensar que la hipoglucemia tiene un papel protector, aunque existe una proporción significativa que no opina lo mismo.

La posibilidad de que la hipoglucemia pueda ser peligrosa ya ha sido apuntada por LE MAY con un modelo diferente de isquemia focal en la rata. Encontró que tanto la hipoglucemia menor de 65 mg/dl como la hiperglucemia eran perjudiciales (LE MAY, 1988), en el caso de su experimento por aumentar los déficits neurológicos observados en la conducta de la rata, y por la mayor mortalidad. También SIEMKOWICZ ha encontrado que las ratas con hipoglucemia, o hiperglucemia postisquémicas se recuperan peor y tienen mayor mortalidad que las normoglucémicas (SIEMKOWICZ, 1981a). En cambio la hiperglucemia previa

seguida de normalización tras la isquemia, en cambio, no tenía peores efectos que la normoglucemia desde un principio, lo que si se confirma en ensayos clínicos en seres humanos, tiene interés terapéutico.

También otros autores han encontrado que tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia impiden la recuperación tras la isquemia cerebral global provocada por un manguito neumático que comprime los vasos del cuello (SIEMKOVICZ, 1978), existiendo tanto en la hipoglucemia como especialmente en la hiperglucemia una mayor mortalidad y un menor grado de recuperación funcional que con la normoglucemia. IBAYASHI concluyó que la hipoglucemia debe ser evitada en la isquemia cerebral porque lleva a severos trastornos metabólicos y disminución de la supervivencia (IBAYASHI, 1986).

En condiciones de hipoglucemia experimental marcada, pequeñas variaciones de tensión arterial conducen a marcados cambios de flujo sanguíneo cerebral, es decir, a una pérdida de la autoregulación (SIESJÖ, 1983), lo que repercute desfavorablemente sobre el infarto cerebral.

La hipoglucemia, a diferencia de la isquemia, daña más las capas superiores de la corteza, que es por donde se transmite una onda inhibitoria que recorre lentamente la corteza cerebral y que se ha llamado la "depresión propagada" descrita por LEAO. Por ello se ha propuesto que este fenómeno media el daño celular producido por hipoglucemia.

Los efectos de la insulina en la utilización cerebral de glucosa son discutidos: mientras que algunos no han encontrado efectos (HOM, 1984) o han constatado una disminución (GRUNSTEIN, 1985) de la utilización de glucosa, otros han hallado un aumento de la captación (HERTZ, 1981) o de la utilización de la glucosa por el cerebro (LUCIGNANI, 1987), lo que podría ser perjudicial, dado que un aumento del metabolismo de la glucosa implicaría un aumento del ácido láctico.

Se ha propuesto para la insulina un papel de factor trófico neuronal, de tal forma que no actuaría solo a través de la hipoglucemia que produce, sino también de forma directa. Esta hipótesis procede de estudios (VOLL, 1991) en los que el

efecto protector de la insulina se mantenía en un modelo de isquemia global a pesar de contrarrestar la hipoglucemia mediante glucosa. Aunque este modelo no es de isquemia focal como el que nosotros utilizamos, nuestros datos no apoyan ésta hipótesis, dado que el grupo de hipoglucemia posterior a la oclusión vascular que recibió mayor cantidad de insulina por unidad de peso, tiene mayor volumen de infarto que el de normoglucemia, y no se diferencia significativamente del de hiperglucemia que no recibió insulina. En un estudio clínico prospectivo, niveles elevados de insulina en ayunas fueron un factor de riesgo para tener un ictus en ancianos no diabéticos (KUUSISTO, 1994).

Como resumen podríamos decir que tanto la hiperglucemia, como el provocar una hipoglucemia dos horas después de que se ha producido un infarto cerebral, se asocian a mayores infartos cerebrales que si la hipoglucemia se instaura antes del infarto en éste modelo de isquemia focal. En cambio, el mantener la glucemia en límites normales o el producir un hipoglucemia previa al infarto, son las dos situaciones en las que el infarto cerebral es de menor tamaño.

En general, los datos clínicos y experimentales existentes apoyan nuestros resultados sobre el papel perjudicial de la hiperglucemia, y de hecho es ya uno de los parámetros que se controla específicamente en los accidentes cerebrovasculares del ser humano con objeto de evitarla.

En cuanto a la hipoglucemia, nuestros resultados indican que puede disminuir el tamaño del infarto si se instaura antes de la isquemia, pero cuando se inicia dos horas después puede aumentarlo. No se pueden extrapolar directamente resultados experimentales a los seres humanos, y dado que la hipoglucemia no se ha utilizado en enfermos que padecen isquemia cerebral, no es posible predecir su efecto sin recurrir a ensayos clínicos. Pero para el diseño de ensayos clínicos humanos hay que tener en cuenta los datos de experimentación animal, que en nuestro caso indican que puede ser protectora una hipoglucemia moderada y previa a la isquemia. Esta aplicación en el hombre puede estudiarse en operaciones con riesgo de isquemia global (cirugía cardíaca) o focal (endarterectomía carotídea o cirugía o embolización terapéutica de vasos intracraneales), situaciones en las que la hipoglucemia puede instaurarse al inicio de la cirugía. También podría explorarse en los primeros

momentos del accidente cerebrovascular.

Encontramos que la normoglucemia fue, tras la hipoglucemia previa a la isquemia, la situación que se asoció a infartos cerebrales más pequeños. Dado que no hubo diferencias significativas respecto a la hipoglucemia previa, y que la hipoglucemia no está ensayada en el ser humano, nuestro estudio sugiere que mantener una glucemia en rangos normales debe ser nuestro objetivo cuando se produce un infarto cerebral, que es la enfermedad humana a la que más se asemeja nuestro modelo de isquemia focal.

E.2 DISCUSION DEL EXPERIMENTO SOBRE TEMPERATURA E INFARTO CEREBRAL.

En la segunda parte de este trabajo se pretendía evaluar si las variaciones en la temperatura cerebral y corporal influyen en la extensión del infarto cerebral, en el mismo modelo experimental de isquemia cerebral focal que se utilizó anteriormente.

Como se ha reflejado en la **INTRODUCCION**, la isquemia cerebral global está claramente influenciada por la temperatura. Sin embargo, en la isquemia focal, que es la que se produce en los accidentes cerebrovasculares y que es la situación más común en el hombre, el papel de la temperatura no está aclarado. Por ejemplo, existen trabajos recientes que únicamente encuentran protección si la isquemia es global pero no si es focal (MORIKAWA, 1991).

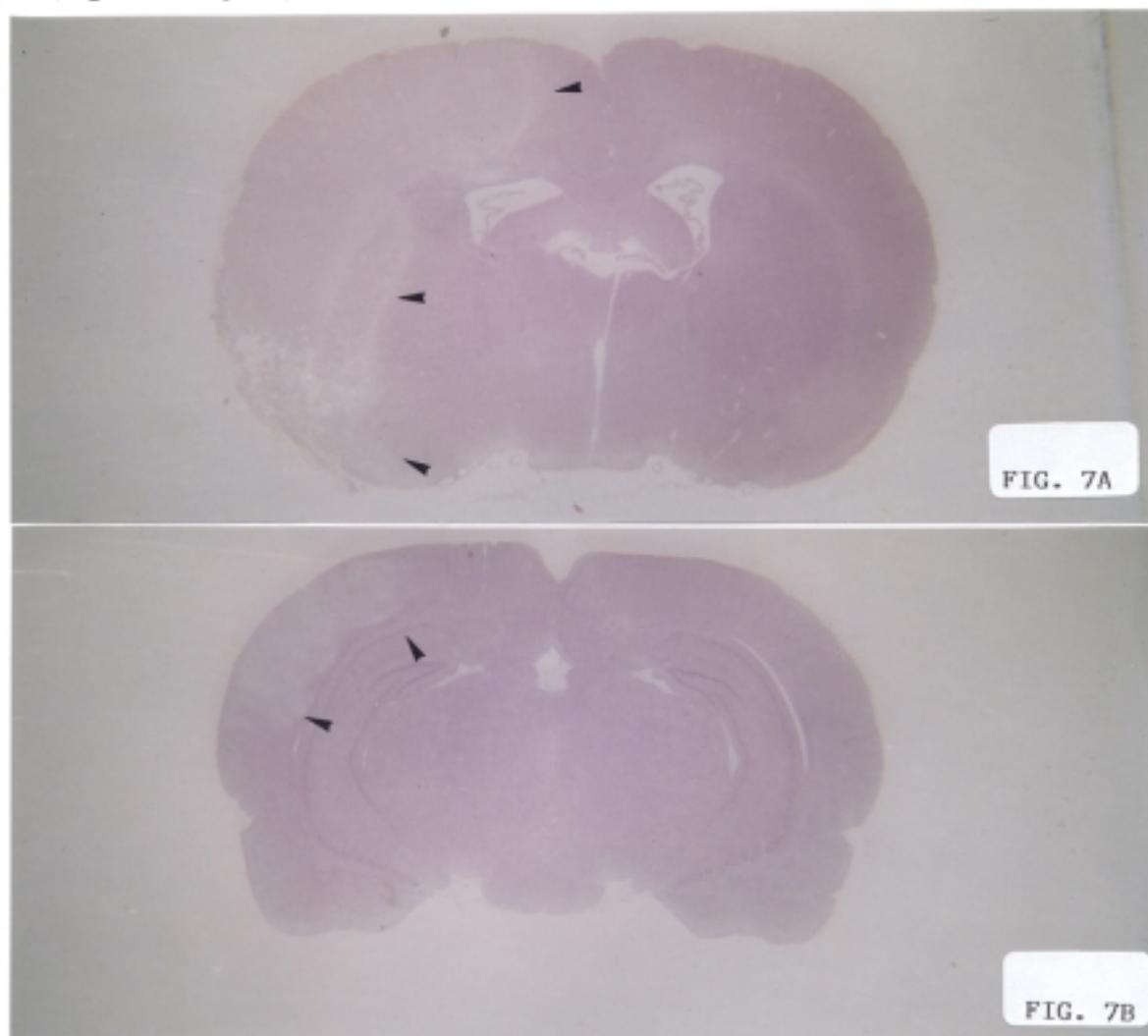
En clínica humana, aunque en situaciones de riesgo de isquemia cerebral global como es la cirugía cardiaca con circulación extracorpórea, viene empleándose la hipotermia, en algunos estudios ello ha originado mayores secuelas neurológicas que si no se utiliza (SINGH, 1995), por lo que el tema merece un mayor estudio.

Por lo tanto, como se ha indicado en **MATERIAL Y METODOS**, se establecieron dos grupos: **grupo 5 de Normotermia**, y **grupo 6 de Hipotermia**, homogéneos entre sí excepto en las variaciones de temperatura que se indujeron en los mismos.

Al igual que en el estudio anterior, consideramos el volumen de infarto cerebral proporcional al volumen cerebral total (variable **VOLPROI**) como la variable dependiente más relevante para mostrar la influencia de las dos condiciones experimentales utilizadas en los grupos, aunque en este caso no hay diferencias entre grupos en cuanto a volumen cerebral total (variable **VOLTCP**), por lo que el volumen total de infarto cerebral (variable **VOLTOI**) tiene igual relevancia que el volumen proporcional de infarto.

Como puede verse en el apartado de **RESULTADOS (Tabla 34)**, el

volumen de infarto cerebral proporcional al volumen cerebral total (VOLPROI) es prácticamente la mitad en el **grupo 6 de Hipotermia** ($6,320 \pm 1,01$) que en el **grupo 5 de Normotermia** ($12,162 \pm 1,59$), lo que resulta estadísticamente significativo. También el volumen de infarto cerebral total (variable VOLTOI, **Tabla 35**) es significativamente menor en el **grupo 6 de Hipotermia** ($60,948 \text{ mm}^3 \pm 9,53$), que en el **grupo 5 de normotermia** ($119,969 \text{ mm}^3 \pm 15,28$). En ambos casos el volumen de infarto en hipotermia es prácticamente la mitad que en normotermia (**Figuras 7A y 7B**).



Figuras 7A y 7B. Cortes coronales de cerebro de rata del grupo de normotermia (7A), y del grupo de hipotermia (7B). Tinción de hematoxilina-eosina. Área de infarto más pálida, con borde medial señalado con cabezas de flechas.

Como en el estudio anterior, nos planteamos si estos resultados no podrían estar contaminados por variables secundarias como el volumen ventricular o el artefacto quirúrgico que pudieran afectar de forma diferente a los dos grupos. Esto era muy improbable, pues como vimos en el apartado de **RESULTADOS**, no existían diferencias significativas entre los grupos en cuanto a los valores de estas variables. De cualquier manera, se volvieron a calcular los volúmenes de infarto cerebral total y proporcional restando el volumen ventricular, el volumen de artefacto (si existía) y la suma de ambos, encontrándose que se mantienen las diferencias referidas (**Tablas 36-38**).

Siguiendo la misma metodología que en el estudio anterior, se midieron por separado la corteza cerebral y los ganglios basales así como el volumen de infarto cerebral que les correspondía, y qué proporción del volumen total ocupaban, con el fin de averiguar si la hipotermia y la normotermia afectaban de forma diferente a las áreas isquémicas de la corteza cerebral y de los ganglios basales.

En la corteza encontramos un volumen total de infarto cortical (VOLTICOR, **Tabla 40**) de $106 \pm 12,75 \text{ mm}^3$ en el **grupo 5 de Normotermia**, mientras que en el **grupo 6 de Hipotermia** fue de $57,56 \pm 8,73 \text{ mm}^3$. El volumen de infarto cortical proporcional al volumen cerebral total (VOLPICOR, **Tabla 39**) fue de $10 \pm 1,28$ para el **grupo 5 de Normotermia** y de $5,96 \pm 0,92$ para el **grupo 6 de Hipotermia**. Vemos por tanto que la hipotermia reduce el infarto cortical aproximadamente a la mitad, diferencia significativa estadísticamente.

Respecto a los ganglios basales, el volumen total de infarto (VOLTIGB, **Tabla 42**) fue de $14,03 \pm 3,47 \text{ mm}^3$ en el **grupo 5 de Normotermia**, mientras que fue de $3,34 \pm 1,50 \text{ mm}^3$ en el **grupo 6 de Hipotermia**. El volumen de infarto de ganglios basales respecto al volumen cerebral total (VOLPIGB, **Tabla 41**) es de $1,37 \pm 1,66$ en el **grupo 5 de Normotermia**, mientras que en el **grupo 6 de Hipotermia** fue de $0,33 \pm 0,72$, diferencias todas ellas significativas. Vemos que la hipotermia reduce el infarto en los ganglios basales a menos de la tercera parte, mientras que en la corteza ésta reducción es de la mitad.

Una mayor protección de los ganglios basales por la hipotermia también la

ha hallado BUSTO, con un modelo de isquemia diferente (isquemia global, no focal), aunque esta cuestión en general ha recibido poca atención. Con una hipotermia de 30-31 °C, este autor encontró una reducción del daño isquémico especialmente en el estriado dorsolateral donde se reducía en un 80% (BUSTO, 1987). También en nuestro experimento los ganglios basales, que incluyen este área selectivamente vulnerable, son la zona que experimenta mayor reducción de infarto. Otros autores han descrito la respuesta del caudoputamen isquémico a la temperatura como de tipo "todo o nada", con necrosis extensa del mismo con isquemias de 15 minutos a 37 °C, pero protección total a 35 °C (MINAMISAWA, 1990). En nuestro experimento la protección no es total, pero el área de infarto de los ganglios basales que queda en condiciones de hipotermia, es mínima (3,344 mm³).

Este tipo de respuesta a la reducción de temperatura del caudoputamen es distinto del que tienen las poblaciones neuronales selectivamente vulnerables a la isquemia (área CA₁ y subículo del hipocampo), en las que un aumento de dos grados produce pannecrosis celular, similar a la que se produciría con un aumento de la duración de la isquemia, pero a diferencia del caudoputamen, la reducción de la temperatura tiene un efecto protector de tipo gradual.

El motivo de la mayor reducción del infarto en los ganglios basales respecto a la corteza puede ser que las distintas poblaciones neuronales tengan diferente susceptibilidad a la temperatura, pero es más probable que se deba a su peculiar vascularización: los ganglios basales constituyen una región arterial terminal y que por lo tanto no recibe circulación colateral como la corteza. Experimentalmente, la reperfusión tras el infarto (en el caso de la corteza, por circulación colateral) se asocia a un mayor daño histológico (DIETRICH, 1987) y ése puede ser el motivo por el que en la corteza el grado de protección sea menor.

De cualquier manera, y al igual que otros autores (KULUZ, 1992), hemos encontrado protección tanto en corteza como en ganglios basales, por lo que la reducción de la temperatura influye en la isquemia en ambas estructuras.

Nos planteamos si dentro de la corteza la localización del infarto era igual en situación de normotermia que en hipotermia, pues podría existir alguna zona en

el área de la corteza cerebral vascularizada por la arteria cerebral media especialmente sensible o resistente a la protección que parece ofrecer la hipotermia, cuestión que no se había estudiado hasta ahora. Para ello se midió, como en el estudio anterior, el porcentaje de infarto anterior (VOLIPRES) y posterior (VOLIPPOS) a la cisura de Rolando. No existieron diferencias significativas entre el **grupo 5 de Normotermia** y el **grupo 6 de Hipotermia** respecto a la distribución del infarto en la corteza, estando en ambos grupos localizado aproximadamente la mitad del volumen de infarto a cada lado de la cisura de Rolando. Por lo tanto pensamos que la influencia de la hipotermia en la corteza isquémica es similar en la parte anterior y posterior de la distribución de la arteria cerebral media.

Al revisar la literatura encontramos que la mayoría de los autores está de acuerdo con que la hipotermia reduce el volumen de infarto cerebral.

Se comenzó a estudiar la hipotermia en estudios animales experimentales en la década de 1950, encontrándose que una disminución de 5-10 °C disminuía el daño isquémico al cerebro (ROSOMOFF, 1957). La hipotermia se ha venido utilizando empíricamente desde hace mucho tiempo en la cirugía con bypass cardiaco y otras en las que la circulación cerebral puede verse comprometida. Sin embargo el interés en el estudio de la influencia de la temperatura en la isquemia cerebral no resurgió hasta hace relativamente poco (BERNTMAN, 1981; VACANTI, 1984).

Algunos de los primeros autores que estudiaron la cuestión (STEEN, 1979a; MICHENFELDER, 1977) atribuyeron a la hipotermia un papel dañino en la isquemia cerebral, pero casi todos los trabajos posteriores han encontrado una acción protectora.

Cuando se ha aplicado hipotermia a modelos de isquemia global (como en el que se ocluyen los cuatro vasos que irrigan el cerebro en la rata), se ha observado que pequeñas reducciones de 3-4 °C de temperatura aportan protección (BUSTO, 1987). Pequeños aumentos de temperatura en cambio, empeoran el daño por isquemia (DIETRICH, 1990b).

Desde entonces ha aumentado el número de estudios y el efecto protector de

la hipotermia moderada se ha encontrado en otros modelos experimentales como el del gerbo (CLIFTON, 1989) en el que una disminución de 2 °C en la temperatura rectal producía una protección casi completa en las neuronas del área CA₁ hipocámpica. Otros autores también han encontrado que pequeñas disminuciones de temperatura reducen el daño cerebral por isquemia global (CHOPP, 1989; MINAMISAWA, 1990; WELSH, 1990).

En modelos de isquemia focal (oclusión permanente de la arteria cerebral media como es el utilizado por nosotros), al permitir un enfriamiento espontáneo hasta 33 °C, se han encontrado reducciones del volumen de infarto del 77 % , e instaurando la hipotermia de 33 °C una hora después de la isquemia, la reducción ha sido del 54% (KADER, 1992; MOYER, 1992). Nuestros resultados muestran también una reducción aproximada de la mitad del volumen del infarto cerebral con hipotermia.

No solo en el cerebro sino en otros tejidos nerviosos como la médula espinal, la hipotermia parece tener un papel protector (VACANTI, 1984). En ratas con isquemia espinal, reducciones de la temperatura de 34-27 °C aportan protección tanto histopatológica como recuperación funcional (MARSALA, 1994). En cultivos celulares también ha tenido la hipotermia un acción beneficiosa frente la hipoxia-isquemia, tanto en astrocitos como en neuronas (SHUAIB, 1993).

Ha interesado a los investigadores el "cuánto" de la hipotermia: qué grado es el que beneficia más y qué límites no se deben traspasar para evitar la aparición de efectos perjudiciales. Por cada grado centígrado que reducimos el metabolismo cerebral disminuye en un 8% y con una temperatura de alrededor de 33 °C el metabolismo cerebral baja un 20-30 %, pero no se sabe cuál es la temperatura que protege más en seres humanos.

Parece aceptada la protección que proporciona la hipotermia moderada, pero sobre temperaturas más bajas existe controversia. Para algunos autores hipotermias más acentuadas podrían ser también más protectoras. Así, en perros recién nacidos sometidos a parada cardíaca durante 1,75 horas, un enfriamiento hasta una temperatura rectal de 16 °C ofrecía mayor protección que el enfriamiento a 20 °C,

y éste a su vez era más beneficioso que una temperatura de 24 °C (MUJSCE, 1994). Esto mismo es aplicable a perros adultos, en los que reducir la temperatura cerebral a 10 °C protege más que reducirla a 15 °C (TISHERMAN, 1991). También en un modelo global en la rata, 24 °C protegen más que 34 °C (KULUZ, 1992).

Otros autores contradicen estos estudios, encontrando que hipotermias leves (a 34 °C) tienen un efecto protector sobre el volumen de infarto, mientras que hipotermias marcadas (de 15 °C) aumentan el grado de lesión (WEINRAUCH, 1992).

La discusión del grado óptimo de hipotermia es importante, tanto experimental como clínicamente, pues la reducción de temperatura que ahora se aplica en cirugía cardíaca se hace de una manera empírica, y mayores reducciones pueden ser beneficiosas tanto en ésta situación como en otras de isquemia global (como la parada cardíaca) o en circunstancias de isquemia focal como el ACV, en las que todavía no se ha ensayado.

Nosotros elegimos una hipotermia acentuada pero no extrema, que evitara las complicaciones cardiorespiratorias que se producen en hipotermias muy severas. En nuestro estudio el grupo de hipotermia tenía una temperatura cerebral promediada durante las 24 horas del experimento (TEMPPC) de $25,09 \pm 3,42$ °C, aproximadamente 10 °C menor que el grupo de normotermia cuya temperatura cerebral promediada era de $34,77 \pm 1,51$. Como ya referimos anteriormente, la temperatura cerebral en el grupo de normotermia es unos dos grados menor que la rectal (TEMPPR $37,11 \pm 0,38$ °C), que se mantuvo alrededor de los 37 °C. Ello está descrito en la literatura y se debe a que la sonda cerebral mide la temperatura de la superficie del cerebro, que pierde calor por la craneotomía (BUSTO, 1986). Como también vimos en el apartado de **RESULTADOS**, en el grupo de hipotermia, la reducción de la temperatura cerebral (10 °C aproximadamente), fue mayor que la reducción de temperatura rectal (6 °C aproximadamente), para evitar complicaciones sistémicas de la hipotermia. Ello se consiguió enfriando el cráneo por un sistema independiente y regulable según la monitorización continua que teníamos de la temperatura cerebral (ver **MATERIAL Y METODOS**).

La temperatura cerebral aplicada se puede conseguir en el ser humano y no tiene muchas complicaciones si, como veremos, no se mantiene durante mucho tiempo. La reducción de volumen de infarto en nuestro grupo hipotérmico habla en favor de que no solo con la hipotermia leve sino también cuando es más marcada, hay disminución del daño cerebral por isquemia.

También se han estudiado las consecuencias metabólicas que tienen los diferentes grados de reducción de la temperatura. Como uno de los principales mecanismos protectores propuestos para la hipotermia es la disminución del consumo cerebral de oxígeno, se ha intentado establecer qué relación guarda dicho consumo con las disminuciones de temperatura. Algunos defienden que dicha relación es lineal entre los 37 y 22 °C (MUJSCE, 1994), y temperaturas cada vez menores seguirían disminuyendo el consumo de oxígeno, por lo que tendría sentido intentar conseguir la temperatura más baja posible. Por cada grado de temperatura que desciende, el consumo de oxígeno se reduce en un 5% (SIESJÖ, 1978). Otros autores no han encontrado esta reducción lineal, sino reducciones mayores en el consumo de oxígeno, a menores temperaturas. El Q_{10} (el cociente entre el metabolismo de oxígeno a dos temperaturas separadas por 10 °C) en perros con temperaturas cerebrales entre 37 y 27 °C es de 2'2 y es de 4'5 en el intervalo de 27 a 14 °C, por lo que según disminuimos la temperatura, las reducciones de consumo de oxígeno son proporcionalmente mayores. De esta manera, con temperaturas entre 14 y 17 °C, el consumo de oxígeno es solo un 10 % del que se produce en normotermia (MICHENFELDER, 1992).

Para otros, la relación es logarítmica y la disminución de temperaturas cada vez afectaría menos al consumo de oxígeno, y por debajo de determinado valor no habría más protección. No existe acuerdo en ésta cuestión, y por eso hay autores que han aplicado hipotermias de solo 2-4 °C respecto a la temperatura basal (BUSTO, 1987), mientras que otros han aplicado hipotermias profundas (TISHERMAN, 1991; MICHENFELDER, 1992). Por último, otros autores han encontrado que la hipotermia leve tras parada cardiaca no modifica la captación de oxígeno (OKU, 1993). Otro parámetro de actividad cerebral como es el EEG, muestra que la máxima reducción de actividad en el intervalo de 37 °C a 18 °C, se produce entre 28 los y los 18 °C (STEEN, 1983).

Otra cuestión importante es el "cuándo" de la hipotermia: cuánto tiempo puede demorarse su aplicación tras la isquemia sin que desaparezca su acción protectora, y cuánto tiempo debe durar para que tenga efectos beneficiosos y no aparezcan complicaciones sistémicas o cerebrales.

La primera pregunta que se plantea es: ¿es necesaria la aplicación inmediata de la hipotermia tras la isquemia, o mantiene su efecto benéfico aunque se demore su instauración?. Esto tiene un interés práctico, pues una instauración inmediata es difícil en muchos casos de accidente cerebrovascular del ser humano. Respecto a ésta cuestión, los primeros autores que estudiaron la hipotermia (ROSOMOFF, 1957) solo la encontraron efectiva si se aplicaba inmediatamente. Posteriormente los resultados han sido variables y han dependido del tipo de isquemia en el que se aplica.

En isquemia focal irreversible que es el modelo que nosotros utilizamos, algunos investigadores no han observado protección cuando la isquemia se produce en normotermia y se instaura la hipotermia pasado un tiempo (RIDENOUR, 1992; MOYER, 1992), mientras que otros autores sí han encontrado efecto beneficioso con hipotermias instauradas una hora después de la isquemia (KADER, 1992; MOYER, 1992; ZHANG, 1993). También en los modelos de isquemia global los resultados son contradictorios (KULUZ, 1992).

En isquemia focal reversible, aun retrasando la hipotermia una hora tras provocar la isquemia (ZHANG, 1993), o incluso de una a cuatro horas (MORIKAWA, 1992; RIDENOUR, 1992), hay una reducción significativa del tamaño del infarto de alrededor del 50 % con una hipotermia moderada (30-33 °C). Otros encuentran igualmente protección si la hipotermia se aplica durante la isquemia que si se instaura posteriormente, durante la reperusión (XUE, 1991). De todas maneras, esta protección es menor cuando retrasa la hipotermia que si se instaura la hipotermia desde el inicio de la isquemia (CHEN, 1992). También la temperatura a la que se realiza la reperusión influye en la lesión patológica (BUCHAN, 1990; KUROIWA, 1990).

La protección por hipotermia retrasada en estudios de oclusión arterial

transitoria es de interés desde el punto de vista clínico, pues podría utilizarse para salvar tejido cerebral tras la reperfusión que se produce al repermeabilizar un vaso cerebral ocluido en seres humanos por medio de la trombolisis. La hipotermia y la trombolisis, que son efectivos por separado en modelos experimentales, se han utilizado también en combinación, comprobándose su eficacia conjunta para disminuir el área de infarto, aunque probablemente la hipotermia sea más eficaz que la trombolisis (MEDEN, 1994). Sin embargo la hipotensión oliguémica reduce el efecto protector de la hipotermia (KEYKHAH, 1982), por lo que es de esperar que en el futuro se restaure el flujo por trombolisis y se añada hipotermia para proporcionar una mayor protección.

En nuestro estudio se aplicó la hipotermia desde el inicio de la cirugía, es decir intraisquémica, que como hemos visto, experimentalmente ha mostrado mayores efectos neuroprotectores que cuando se aplica posteriormente a la isquemia (WELSCH, 1991; BORIS-MÖLLER, 1990). También hay situaciones clínicas en el ser humano en que la isquemia puede aplicarse desde el primer momento, como es la cirugía vascular cerebral de alto riesgo en que se puede instaurar la hipotermia previamente a la cirugía. Así, la endarterectomía carotídea, la oclusión de aneurismas o malformaciones arteriovenosas tanto por cirugía como por catéteres endovasculares y el vasospasmo de las hemorragias subaracnoideas, son todas ellas situaciones en las que con una menor o mayor probabilidad puede esperarse una complicación en forma de isquemia cerebral focal. También los accidentes cerebrovasculares pueden ser diagnosticados y tratados con mucha rapidez dependiendo de la infraestructura y de la educación sanitaria.

También se ha estudiado cuánto tiempo puede mantenerse la hipotermia sin que aparezcan efectos perjudiciales. Mientras que algunos autores encuentran que una temperatura de 24 °C mantenida durante una hora tiene un efecto protector (ONESTI, 1991), otros han hallado un efecto dañino en hipotermias de 25 °C mantenidas durante 48 horas lo que sugiere que hipotermias beneficiosas pueden convertirse en perjudiciales si se prolongan en exceso (MICHENFELDER, 1977; STEEN, 1979a; STEEN, 1980).

Por otra parte, cuando la reducción de la temperatura por debajo de 28 °C

dura más de 24 horas, se producen complicaciones sistémicas al recobrar la temperatura normal, como acidosis, shock y vasoconstricción con reducción del gasto cardiaco, (que al actuar en direcciones opuestas no modifican la tensión arterial, por lo que pueden pasar desapercibidas inicialmente) (STEEN, 1979a). El aumento de resistencia se produce por vasoconstricción de las arteriolas musculares en respuesta a la hipotermia, y cuando se vasodilatan al recalentar el organismo, descargan sus metabolitos ácidos secuestrados, produciendo acidosis metabólica, lo que deprime más la función cardiaca. Esta vasoconstricción también puede afectar al cerebro, que a las 48 horas de permanecer a 28 °C puede tener áreas sin perfundir.

Estas complicaciones son probablemente una de las causas que ha hecho que la hipotermia haya dejado de usarse en patologías en las que se utilizó en el pasado, como los traumatismos craneoencefálicos y la cirugía intracraneal. Sin embargo, los primates (incluido el hombre) parecen ser más resistentes que animales experimentales de menor tamaño a las complicaciones de la hipotermia crónica, por lo que debería ensayarse con todas las precauciones cuando los datos experimentales son esperanzadores, como es el caso de la isquemia cerebral focal, equivalente del ACV del ser humano.

Nosotros mantuvimos la hipotermia durante el tiempo de supervivencia del animal que fueron 24 horas, tiempo suficiente para que se manifiesten las lesiones histológicas y para evitar los problemas metabólicos que se asocian a las hipotermias más prolongadas. En nuestro experimento, el efecto protector con una reducción aproximada del volumen de infarto a la mitad (**Tabla 34 de RESULTADOS**), se consigue con temperaturas cerebrales promediadas de 25,09 °C (TEMPPC) aplicadas durante 24 horas, pero en experimentos de más de 24 horas, y especialmente en aquellos que se prolongan más de 48 horas, la hipotermia puede ser perjudicial.

Los resultados de nuestro experimento, como los de otros autores indican que el efecto protector parece superar claramente a los efectos adversos, especialmente si la hipotermia no es muy prolongada. También la mortalidad fue mayor en el grupo de normotermia que en el de hipotermia, aunque la diferencia no llegó a alcanzar significación estadística (**Tabla 33 de RESULTADOS**), probablemente por

el tamaño de la muestra.

Revisamos a continuación trabajos que han investigado los efectos metabólicos de la hipotermia para intentar averiguar sus mecanismos de acción a nivel bioquímico y celular.

A nivel bioquímico se ha determinado el ATP en el cerebro de ratas recién nacidas sujetas a isquemia focal, y a medida que se disminuye la temperatura, disminuye el tamaño de infarto y la deplección de ATP, por lo que la disminución de las demandas metabólicas con la consecuente conservación del ATP puede ser el mecanismo que explique el efecto protector de la hipotermia (YOUNG, 1983). Por otra parte, la hipotermia también favorece la recuperación metabólica, pues tras una isquemia global que suprime las reservas de ATP, al producirse la recirculación, el pH y dichas las reservas de ATP se recuperan a partir del AMP (SUTTON, 1991). Por el contrario, otros estudios no han encontrado que la hipotermia evite el agotamiento de los fosfatos de alta energía o el aumento de ácido láctico (BUSTO, 1987; NATALE, 1989), y sin embargo constatan un menor daño histológico, por lo que pueden existir además otras explicaciones para su acción beneficiosa.

Así por ejemplo, la hipotermia puede proteger el cerebro isquémico por estabilización de las membranas plasmáticas o reduciendo la síntesis, liberación y recaptación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (MITANI, 1991), tal vez al retrasar la despolarización anóxica retardada (TAYLOR, 1993). De ésta manera se evita la activación del receptor NMDA y la consiguiente entrada de calcio a la neurona.

Otros posibles mecanismos protectores son la reducción del edema cerebral postisquémico y una menor liberación de leucotrienos: la hipotermia puede reducir la liberación de tromboxano B₂ durante la isquemia, evitando su acción vasoconstrictora y proagregante. Aunque la hipotermia no evita que se acumulen los ácidos grasos libres, sí reduce la formación de leucotrieno B-4 que es productor de edema (BUSTO, 1989a).

También se han postulado las siguientes acciones beneficiosas de la

hipotermia: evitar la ruptura de la barrera hematoencefálica (DIETRICH, 1993) (pues la hipotermia revierte parcialmente la extravasación de peroxidasa de rábano); disminuir la capacidad de coagulación sanguínea, y así la formación de microémbolos; una menor formación de radicales libres, pues se ha comprobado en modelos de isquemia global por parada cardíaca en perros, que en hipotermia disminuyen en el cerebro los productos de la peroxidación lipídica como el malondialdehído y consecuentemente también se reduce el consumo de captadores de radicales libres como el glutatión reducido, glutatión peroxidasa y la superóxidodismutasa (BAIPING, 1994). También podría reducir la hipertensión intracraneal (BALDWIN, 1991).

La síntesis de ubiquitina, una proteína importante para mantener la viabilidad celular, podría estar aumentada en hipotermia, lo que puede ser un mecanismo protector en la llamada muerte neuronal retrasada que citamos en el apartado A.3.1. Ello se ha deducido de experimentos con gerbos sujetos a isquemia global, en los que en condiciones de hipotermia, no solo hay mayor densidad neuronal en el hipocampo, sino que en dichas neuronas se recupera la síntesis de ubiquitina (YAMASHITA, 1991). En cambio la proteína del "golpe de calor" HSP-72 no parece ser importante para la acción de la hipotermia (CHOPP, 1992).

Midiendo en gerbos los productos del metabolismo energético del cerebro por medio de la espectroscopia por resonancia magnética "in vivo" al tiempo que se mide el flujo cerebral, se encuentra que el flujo a partir del cual se altera el metabolismo energético es menor en hipotermia, lo que ayuda a explicar la protección por la hipotermia del metabolismo en condiciones de isquemia (GADIAN, 1993). Por éste mismo método se ha comprobado una menor acidosis y una mayor recuperación de la misma en hipotermia que en normo o hipertermia (HARALDSETH, 1992).

En clínica humana no existen ensayos clínicos de ictus e hipotermia, pero sí se ha estudiado la coexistencia de un ictus con hipertermia, encontrándose en general efectos perjudiciales sobre la mortalidad y las secuelas (HINDFELDT, 1976). Esto mismo se ha observado en estudios experimentales, tanto en modelos de isquemia focal (CHEN, 1991) como en modelos de isquemia global (DIETRICH, 1990b). A

nivel bioquímico, cada grado de temperatura que aumenta, incrementa el consumo de oxígeno en un 5-6 % . Aunque no disminuye el ATP ni aumenta el ácido láctico, sí lo hace el aminoácido glutamato, que en concentraciones excesivas es tóxico por un mecanismo excitatorio (CARLSSON, 1976). La hipertemia aumenta la tendencia trombotica de la sangre y disminuye su capacidad trombolítica. También es capaz de inducir la expresión de las "proteínas de golpe de calor" como la HSP 72 que ya hemos comentado en la **INTRODUCCION**. La hipertermia daña la barrera hematoencefálica y por sí sola, en grados extremos, produce cambios histológicos similares al infarto isquémico.

Todavía no se ha ensayado la hipotermia en personas que sufren un accidente cerebrovascular. Pero a pesar de faltar la prueba definitiva del ensayo clínico, la evidencia experimental ha tenido ya consecuencias prácticas: nuevos fármacos que se desarrollan con supuesta acción neuroprotectora para la isquemia cerebral, se comparan en su acción sobre modelos animales con el "estándar de oro" de la hipotermia (BUCHAN, 1992; MATSUMOTO, 1993); cuando se han revisado estudios anteriores de fármacos como los barbitúricos y anestésicos a los que se encontró un papel protector en la isquemia cerebral experimental, dicho efecto protector se ha atribuido a la hipotermia que producían más que al fármaco en sí (STERNAU, 1991). Actualmente las compañías farmacéuticas están desarrollando fármacos específicamente hipotermizantes dirigidos al tratamiento del accidente cerebrovascular humano (HALL, 1993). Aunque no se aplique hipotermia, cada vez más los clínicos tratan enérgicamente la hipertermia que puede coexistir con un accidente cerebrovascular.

Actualmente se utiliza la hipotermia en situaciones de riesgo de isquemia cerebral global como es la cirugía cardiaca con circulación extracorpórea, o en la cirugía simultánea coronaria y de carótidas, cuando por estar ambas carótidas estenosadas, existe riesgo de isquemia cerebral perioperatoria (KOUCHOUKOS, 1994). En ésta situación mantener el corazón en asistolia 30-45 minutos a 15-18 °C es bien tolerado por el cerebro.

Otras aplicaciones que deben ser exploradas en un futuro próximo, son tras la parada cardiaca, en cirugía cerebrovascular de riesgo como es la oclusión de

aneurismas y malformaciones arteriovenosas cerebrales, tanto por vía quirúrgica como por catéter endovascular, la endarterectomía carotídea, el vasospasmo por hemorragia subaracnoidea y en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares, especialmente aquellos en evolución que están empeorando clínicamente.

Como se ha dicho, el modelo de isquemia focal que hemos utilizado remeda el accidente cerebrovascular del ser humano, por lo que con todas las reservas justificadas por las diferencias existentes entre un modelo animal y una enfermedad en el ser humano, es al accidente cerebrovascular donde nuestros resultados sobre la hipotermia pueden extrapolarse.

Nuestro trabajo y otros anteriores de la literatura son coincidentes en el papel protector de la hipotermia, lo que justifica el inicio de ensayos clínicos de hipotermia en accidentes cerebrovasculares. Este podría ser el primer tratamiento efectivo para estos enfermos.

F. CONCLUSIONES.

F. CONCLUSIONES:

El presente trabajo incluye dos estudios: en uno se ha modificado la glucemia y establecido grupos de hiperglucemia, normoglucemia e hipoglucemia, aplicando ésta última tanto después de producir el infarto cerebral, como previamente. En el segundo estudio se indujo hipotermia en un grupo experimental, mientras que se mantuvo la temperatura en otro.

Estas condiciones experimentales se aplicaron en un modelo de isquemia focal no reversible por oclusión intracraneal de la arteria cerebral media de la rata, modelo que remeda el infarto cerebral isquémico del ser humano.

En ambos estudios se ha medido el volumen de infarto cerebral, con objeto de evaluar el efecto que tiene la modificación de la glucemia y la hipotermia en el mismo.

Respecto al primer estudio sobre el efecto de las variaciones de la glucemia sobre el volumen de infarto cerebral en la rata, las conclusiones principales son:

1- Una hipoglucemia instaurada previamente a la oclusión de la arteria cerebral media origina menores volúmenes de infarto cerebral que una hiperglucemia que se induce tras la oclusión.

2- Esta hiperglucemia y mayor volumen de infarto no es solo debido al estrés, pues condiciones experimentales que mantienen el estrés constante pero incrementan la glucemia, aumentan el volumen de infarto cerebral.

3- No es necesario que exista una diabetes mellitus previa para que se manifieste el mayor volumen de infarto citado, que aparece con una hiperglucemia provocada de forma aguda.

4- Una hipoglucemia aplicada previamente a la oclusión vascular ocasiona menores volúmenes de infarto que cuando la hipoglucemia es inducida dos horas después de ocluir la arteria cerebral media.

5- La reducción del volumen de infarto asociada a la hipoglucemia previa respecto a la hiperglucemia e hipoglucemia posteriores al infarto, afecta tanto al volumen total de infarto cerebral, como al volumen de infarto cortical y de los ganglios basales por separado.

6- Por lo tanto, la hipoglucemia previa a la oclusión vascular parece tener un papel protector sobre el cerebro isquémico respecto a las dos situaciones anteriores.

Respecto a la segunda parte del trabajo en la que estudiamos el efecto de la hipotermia en el volumen de infarto cerebral en la rata, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1- Cuando se reduce la temperatura corporal y cerebral, el volumen de infarto cerebral es menor que cuando se mantiene una temperatura normal. En concreto, una reducción aproximadamente de 10 °C de la temperatura cerebral, tiene efectos protectores.

2- Esta reducción del tamaño del infarto afecta al volumen total de infarto cerebral, y tanto al volumen de infarto de la corteza cerebral como al de los ganglios basales por separado, siendo particularmente acentuada en ésta última localización.

3- Por lo tanto la hipotermia tiene un papel protector para el cerebro en el modelo de isquemia focal que hemos utilizado respecto al mantenimiento de una temperatura normal.

G. BIBLIOGRAFIA.

G. BIBLIOGRAFIA

ABDUL-RAHMAN, SIESJO BK. A Local cerebral glucose consumption during insulin induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *Acta Physiol Scand* 1980; 110: 149-159.

ADAMS HP Jr, OLINGER CP, BILLER J et al. Usefulness of admission blood glucose in predicting outcome for acute cerebral infarction. *Stroke* 1987; 18: 297.

AGARDH CD, FOLBERGROVA J, SIESJO BK. Cerebral metabolic effects in profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *J Neurochem* 1978; 31: 1135-1142.

AGARDH CD. Severe hypoglycemia leads to accumulation of arachydonic acid in brain tissue. *Acta Physiol Scand* 1980; 109: 115-116.

AGARDH CD. Hypoglycemic brain injury: phospholipids, free fatty acids and cyclic nucleotides in the cerebellum of the rat after 30 and 60 minute of severe insulin induced hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981a; 1: 267-275.

AGARDH CD, KALIMO H, OLSSON Y, SIESJO BK. Hypoglycemic brain injury: metabolic and structural findings in rat cerebellar cortex during profound insulin induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981b; 1: 71-84.

AGARDH CD. Neurophysiological recovery after hypoglycemic coma in the rat: correlation with metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983a; 3: 78-85.

AGARDH CD. Persistent vegetative state with high cerebral blood flow following profound hypoglycemia. *Ann Neurol* 1983b; 14: 482-486.

ALBRECHT J, HILGIER W, SIKORSKA M, MOSSAKOWSKI MJ. Effect of experimental hypoglycemia on the glycogen content and the activity of the glycogen metabolizing enzymes in the rat brain. *J Neuropathol Pol* 1979; 17: 523-533.

AMES A, WRIGHT RL, KOWADA M, THURSTON JM, MAJNO G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968; 52: 437-453.

ANG C, DAWES J. The effects of hyperthermia on human endothelial monolayers: modulation of thrombotic potential and permeability. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 193-199.

ANONIMO. Australian Therapeutic Trial in mild hypertension: report by the management comitee. *Lancet* 1980; 1: 1261-1267.

ARAKI N, GREENBERG JH, SLADKY JT, UEMATSU D, KARP A, REIVICH M. The effect of hyperglycemia on intracellular calcium in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12(3): 469-76.

ASTRUP J, NORBERG K. Potassium activity in cerebral cortex in rats during progressive severe hypoglycemia. *Brain Res* 1976; 103: 418-423.

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): 51-57.

ASTRUP J, BLENNOW G, NILSSON B. Effects of reduced cerebral blood flow upon EEG pattern, cerebral extracellular potassium and energy metabolism in the rat cortex during bicuculine induced seizures. *Brain Research* 1979; 177: 115-126.

ASTRUP J. Inhibition of cerebral oxygen and glucose consumption in the dog by hypothermia, pentobarbital and lidocaine. *Anesthesiol.* 1981; 55: 263-268.

AUER RN, WIELOCH T, OLSSON Y, SIESJO BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol (Berl).* 1984; 64: 177-191.

AUER RN. The dentate nucleus in hypoglycemia: pathology implicating excitoin mediated neuronal necrosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1985; 67: 279-288.

AUER RN. Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 1986; 17: 699-708.

AUER RN, HALL P, INGVAR M, SIESJO BK. Hypotension as a complication of hypoglycemia leads to enhanced energy failure but no increase neuronal necrosis. *Stroke* 1986; 17: 442-449.

BAIPING L, XIUJUAN T, HONGWEI C, QUIMING X, QULING G. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke* 1994; 25: 147-152.

BAKER CJ, ONESTI ST, BARTH KNM, PRESTIGIACOMO CJ y SALOMON RA. Hypothermic protection following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Surg Neurol* 1991a; 36: 175-180.

BAKER CJ, ZORNOW MW, GRAEFE MR, SCHELLER MS, SKILLING SR et al. Hypothermia prevents ischemia induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits. *Stroke* 1991b 22: 666-673.

BALDWIN WA, KIRSCH JR, HURN PD et al. Hypothermic cerebral reperfusion and recovery from ischemia. *Am J Physiol* 1991; 261: H774-H781.

BARON JL, ROUGEMONT, SOUSSALINE F, BUSTANY P, CROUZEL C et al. Local interrelationships of cerebral oxygen consumption and glucose utilization in normal subjects and in ischemic stroke patients: a positron tomographic study. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984; 4: 140-149.

BEDERSON JB, PITTS LH, TSUJI M, NISHIMURA MC, DAVIS RL, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic evaluation. *Stroke* 1986a; 17: 472-476.

BEDERSON,JB; PITTS,LH; GERMANO,SM et al. Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in the rat. *Stroke* 1986b; 17: 1304-1308.

BERGER L. The association of hyperglycemia and cerebral edema in stroke. *Stroke* 1986; 17: 865-871.

BERNTMAN L, WELSH FA, HARP JR. Cerebral protective effect of low grade hypothermia. *Anesthesiology* 1981; 55: 495.

BERRY K, WISNIEWSKY HM, SVARZBEIN L y BAEZ S. On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficits and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J Neurol Sci* 1975; 25: 75-92.

BLOMQVIST P, LINVALL O , WIELOCH T. Lesions on the locus coeruleus system aggravate ischemic damage in the brain. *Neurosci Lett* 1985; 58: 353-358.

BOLTE RG, BLACK PG, BOWERS RS, THORNE JK, CORNELLI HM. The use of extracorporeal rewarming in a child submerged for 66 minutes. *JAMA* 1988; 260: 377-379.

BORIS-MÖLLER F, SMITH ML, SIESJÖ BK. Effects of hypothermia on ischemic brain damage: a comparison of preischemic and postischemic cooling. *Neurosci Res Commun* 1990; 5: 87-94.

BRANSTON NM, HOPE DT, SYMON L. Barbiturates in focal ischemia of primate cortex: effects on blood flow distribution, evoked potential and extracellular potassium. *Stroke* 1979; 10: 647-653.

BRIERLY JB. The threshold and neuropathology of anoxic ischemic cell change. *Arch Neurol* 1973; 29: 367-374.

BRYAN RM. Insufficient supply of reducing equivalents to the respiratory chain in

cerebral cortex during severe insulin induced hypoglycemia in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6: 286-291.

BRYAN RM, HOLLINGER BR, KEEFER KA, PAGE RB. Regional cerebral and neural lobe blood flow during insulin induced hypoglycemia in unanesthetized rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 124-126.

BUCHAN A. Advances in cerebral ischemia: experimental approaches. *Neurologic Clinics* 1992; 10: 49-61.

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, VALDES I, SCHEINBERG P, GINSBERG MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 729-738.

BUSTO R, GLOBUS MY, DIETRICH WD, MARTINEZ E, VALDES I, GINSBERG MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989a; 20: 904-910.

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, GINSBERG MD. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA_{i1} hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett.* 1989b; 101: 299-304.

BUTCHER SP, SANDBERG M, HAGBERG H, HAMBERGER A. Cellular origins of endogenous aminoacids released into the extracellular fluid of the rat striatum during severe insulin induced hypoglycemia. *J Neurochem* 1987; 48: 722-728.

CAMBON H, DEROUESNE C, YELNIKA, DUYCKAERTS C, HAUW JJ. Influence du diabete et de la glycemie sur la taille des infarctus cerebraux et les circonstances du deces. Etude neuropathologique de 77 infarctus sylviens. *Rev Neurol.* 1991; 147: 727-34.

CAMMERMEYER J. The importance of avoiding dark neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 1961; 1: 245-270.

CANDELISE L, LANDI G, ORAZIO EN, BOCCARDI E. Prognostic significance of hyperglycemia in acute stroke. *Arch Neurol* 1985; 42: 661-663.

CARLSSON C, HAGERDAL M, SIESJÖ BK. The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated aminoacids in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 1976; 26: 1001-1006.

CAZZATO G, ZORZON M, MASE G, IONA LG. Hyperglycemia at ischemic stroke onset as prognostic factor. *Ital J Neurol Sci* 1991; 12: 283-288.

CHEN H, CHOPP M, WELCH KM. Effect of mild hyperthermia on the ischemic infarct volume after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 1991; 41: 1133-1135.

CHEN H, CHOPP M, ZHANG ZG, GARCIA JH. The effect of hypothermia on transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12: 621-628.

CHEW W, KUCHARCZYK J, MOSELEY M, DERUGIN N, NORMAN D. Hyperglycemia augments ischemic brain injury: in vivo MR imaging spectroscopic study with nicardipine in cats with occluded middle cerebral arteries. *AJNR* 1991; 12: 603-609.

CHOPP M, WELCH KM, TIDWELL CD, KNIGHT R, HELPERN JA. Effect of mild hyperthermia on recovery of metabolic function after global cerebral ischemia in cats. *Stroke* 1988a; 19: 1521-1525.

CHOPP M, WELCH KM, TIDWELL CD, HELPERN JA. Global cerebral ischemia and intracellular pH during hyperglycemia and hypoglycemia in cats. *Stroke* 1988b; 19: 1383-1387.

CHOPP M, CHEN H, DERESKY MO, GARCIA JH. Mild hypothermic intervention after graded ischemic stress in rats. *Stroke* 1991; 22: 37-43.

CHOPP M, LI Y, DERESKI MO et al. Hypothermia reduces 72-kDa heat-shock protein induction in rat brain after transient forebrain ischemia. *Stroke* 1992; 23: 104-107.

CHOPP M, KNIGHT R, TIDWELL C et al. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989; 9: 141.

CHURN SB, TAFT WC, De LORENZO RJ. Effects of ischemia on multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II in the gerbil. *Stroke* 1990; 21 (Suppl III): III-112 - III-116.

CILLUFO JM, ANDERSON RE, MICHENFELDER JD, SUNDT TM. Cerebral blood flow, brain pH and oxidative metabolism in the cat during severe insulin-induced hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1982; 2: 337-346.

CLIFTON GL, TAFT WC, BLAIR RE, CHOI SC, De LORENZO RJ. Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1545-1552.

COMBS DJ, REULAND DS, MARTIN DB, ZELENOCK G y D'ALECY LG. Glycolytic inhibition by 2-Deoxyglucose reduces hyperglycemia associated mortality and morbidity in the ischemic rat. *Stroke* 1986; 17: 989-994.

COMBS DJ, DEMPSEY RJ, DONALDSON D, KINDY MS. Hyperglycemia supresses c-fos expression followin transient cerebral ischemia in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12: 169-172.

COX DWG, MORRIS PG, FEENEY J y BACHELARD HS. ³¹P NMR studies of cerebral energy metabolism under conditions of hypoglycemia and hypoxia in vitro. *Biochem J.* 1983; 212: 365-370.

COYLE P, JOKELAINEN PT. Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 1982a; 13: 855-859.

COYLE P. Dorsal arterial cerebral collaterals of the rat. *Anat Rec* 1982b; 203: 397-404.

CREMER JE, CUNNINGHAM VJ, SEVILLE MP. Relationships between extraction and metabolism of glucose, blood flow and tissue blood volume in regions of rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983; 3: 291-302.

CROWELL RM, MARCOUX FW, De GIROLAMI U. Variability and reversibility of focal cerebral ischemia in unanesthetized monkeys. *Neurology* 1981; 31: 1295-1302.

DAVALOS A, MOSTACERO E. Infarto cerebral progresivo. Estudio de los factores determinantes del deterioro neurológico. En: MATIAS GUIU J, MARTINEZ VILA E, MARTI VILALTA JL, eds. *Isquemia cerebral*. Barcelona: MCR; 1990: 265-270.

DE COURTEEN MYERS GM, YAMAGUCHI S, WAGNER KR, TING P, MYERS RE. Brain injury from marked hypoxia in cats: role of hypotension and hyperglycemia. *Stroke* 1985; 16: 1016-1021.

DE COURTEEN MYERS GM, MYERS RE, SCHOOLFIELD L. Hyperglycemia enlarges infarct size in cerebrovascular occlusion in cats. *Stroke* 1988; 19:623-630.

DE COURTEN MYERS GM, KLEINHOLZ M, WAGNER K, MYERS R. Fatal strokes in hyperglycemic cats. *Stroke* 1989; 20: 1707-1715.

DE COURTEN MYERS GM, KLEINHOLZ M, HOLM P, DE VOE G, SCHMITT G et al. Hemorrhagic infarct conversion in experimental stroke. *Ann Emerg Med*. 1992; 21(2): 120-6.

DELLA PORTA P, MAIOLO AT, NEGRI VV, ROSSELLA E. Cerebral blood flow and metabolism in therapeutic insulin coma. *Metabolism* 1964; 13: 131.

DEROUESNE C, CAMBON H, YELNIK A, DUYCKAERTS C, HAUW JJ. Infarcts in the middle cerebral artery territory. Pathological study of the mechanisms of death. *Acta Neurol Scand.* 1993; 87(5): 361-6.

DIETRICH WD, BUSTO R, YOSHIDA S, GINSBERG MD. Histopathological and hemodynamic consequences of complete versus incomplete ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 300-308.

DIETRICH WD, BUSTO R, HALLEY M, VALDES I. The importance of brain temperature in alterations of the blood brain barrier following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990a; 49:486-497.

DIETRICH WD, BUSTO R, VALDES I, LOOR Y. Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1990b; 21: 1318-1325.

DIETRICH WD, ALONSO O, BUSTO R. Moderate hyperglycemia worsens acute blood-brain barrier injury after forebrain ischemia in rats. *Stroke.* 1993; 24: 111-6.

DUCKROW RB, BEARD DC, BRENNAN RW. Regional cerebral blood flow decreases during chronic and acute hyperglycemia. *Stroke* 1987a; 18: 52-58.

DUCKROW RB, BRYAN RM. Regional cerebral glucose utilization during hyperglycemia. *J Neurochem* 1987b; 48: 989-993.

DUVERGER D, MACKENZIE ET. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration and age. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988; 8: 449-461.

EISENBERG S, SETZLER HS. The cerebral metabolic effects of acutely induced hyperglycemia in human subjects. *Metabolism* 1962; 11: 1162.

FEISE G, KOGURE K, BUSTO R, SCHEINBERG P, REINMUTH OM. Effect of insulin hypoglycemia upon cerebral energy metabolism and EEG activity in the rat. *Brain Res* 1976; 126: 263-280.

FLAMM ES, DEMOPOULOS HB, SELIGMAN HL, POSER RG, RANSOHOFF J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 1978; 9:445-447.

FOLBERGROVA J, MEMEZAWA H, SMITH ML, SIESJÖ BK. Focal and perifocal changes in tissue energy state during middle cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 25-33.

FOSTER JW, HART RG. Hypoglycemic hemiplegia: two cases and a clinical review. *Stroke* 1987; 18: 944-946.

FRATIGLIONI L, MASSEY EW, SCHOENBERG DG, SCHOENBERG BS. Mortality from cerebrovascular disease: international comparisons and temporal trends. *Neuroepidemiology* 1983; 2: 101-106.

FUKOAKA S, YEH E, MANDYBUR TI, TEW JM Jr. Effect of insulin on acute experimental cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 1989; 20: 396-399.

FULLER JH, SHIPLEY MJ, ROSE G, JARRET RJ, KEEN H. Mortality from coronary heart disease and stroke in relation to the degree of glycemia: the Whitehall study. *Br Med J* 1983; 287: 867-870.

GADIAN DG, ALLEN K, VAN BRUGGEN N, BUSZA AL, KING MD, WILLIAMS SR. Applications of NMR spectroscopy to the study of experimental stroke in vivo. *Stroke*. 1993; 24(12 Suppl): I57-9.

GALE EA. Hypoglycemia. *Clin Endocr Metab* 1980; 9: 461-475.

GARCIA JH, YOSHIDA Y, CHEN H, LI Y, ZHANG ZG et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 1993; 142: 623-635.

GARCIA de YEBENES J, MENA MA. Efecto de la hipoglucemia inducida por la insulina sobre el metabolismo de las monoaminas. *Rev Clin Esp*. 1984; 172: 197-200.

GARDINER RM. The effect of hypoglycemia on cerebral blood flow and metabolism in the newborn calf. *J Physiol (Lon)* 1980; 298: 37-51.

GARDINER M. Effect of blood glucose concentration on brain lactate accumulation during severe hypoxia and subsequent recovery of brain energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1982; 2: 429-438.

GHAJAR JBC, PLUM F, DUFFY TE. Cerebral oxidative metabolism and blood flow during acute hyperglycemia and recovery in unanesthetized rats. *J Neurochem* 1982; 38: 397-409.

GIBSON CE, BLASS JP. Impaired synthesis of acetylcholine in brain accompanying mild hypoxia and hypoglycemia. *J Neurochem* 1976; 27: 37.

GIFFARD R, MONYER H, CHRISTINE C, CHOI D. Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity and oxygen glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* 1990; 506: 339-342.

GINSBERG, WELSH FA, BUDD W. Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat: I. Local cerebral blood flow and glucose utilization. *Stroke* 1980; 11: 347-354.

GINSBERG MD. Regional glucose utilization and blood flow following forebrain ischemia in the rat: correlation with neuropathology. *Ann Neurol.* 1985; 18: 470-481

GINSBERG MD, PRADO R, DIETRICH WD, BUSTO R, WATSON BD. Hyperglycemia reduces the extent of cerebral infarction in rats. *Stroke* 1987; 18: 570-574.

GINSBERG MD, BUSTO R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627-1642.

GIROUD M, CHIRPAZ L, BEURIAT P, D'ATHIS P, DUSERREL et al. Hyperglycémie à la phase initiale d'un accident vasculaire cérébral. *Indice de*

mauvais pronostic. *Presse Med* 1987; 16: 1079-1082.

GJEDDE A, DIEMER NH. Hyperglycemia protects against neuronal injury around experimental brain infarct. *Neurological Research* 1987; 9: 241-244.

GORELL JM, DOLKART PH, FERRENDELLI JA. Regional levels of glucose, aminoacids, high energy phosphates and cyclic nucleotides in the central nervous system during hypoglycemic stupor and behavioural recovery. *J Neurochem* 1976; 27: 1043-1049.

GORELL JM, NAVARRO CP, SCHWENDNER SPW. Regional CNS levels of acetylcholine and choline during hypoglycemic stupor and recovery. *J Neurochem* 1981; 36: 321-324.

GRAHAM GD, BLAMIRE AM, HOWSEMAN AM, ROTHMAN DL, FAYAD PB et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebral lactate and other metabolites in stroke patients. *Stroke* 1992; 23: 333-340.

GRAY CS, FRENCH JM, CARTLIDGE NE, VENABLES GS, JAMES OF. Increasing age, diabetes mellitus and recovery from stroke. *Postgrad Med J.* 1989; 65: 720-724.

GRUNSTEIN HS, JAMES DE, STORLIEN LH, SMYTHE GA, KRAEGEN EW. Hyperinsulinemia supresses glucose utilization in specific brain regions: in vivo study using euglycemic clamp in the rat. *Endocrinology* 1985; 116: 604-610.

GURUPRAKASH GH, RAO MG, KRISHNAN EC y POULOSE KP. Lactic acidosis and hypoglycemia: experimental evidence to show lactate prevents insulin induced seizures in rats. *Am J Med Sci* 1983; 285: 34-37.

HALL ED, ANDRUS PK, PAZARA KE. Protective efficacy of a hypothermic pharmacological agent in gerbil forebrain ischemia. *Stroke.* 1993; 24: 711-5.

HARALDSETH O, GRONAS T, SOUTHON T, THOMMESSEN L,

BORCHGREVNIK G et al. The effects of brain temperature on temporary global ischaemia in rat brain. A 31 P phosphorous NMR spectroscopy study. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1992; 36: 393-9.

HARRIS RJ, WIELOCH T, SYMON L, SIESJO BK. Cerebral extracellular calcium activity in severe hypoglycemia: relation to extracellular potassium and energy state. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984; 4: 187-193.

HELGASON CM, KUHLMAN, D. The significance of glycosylated hemoglobin for stroke outcome. (Resumen). *Stroke* 1987; 18: 296.

HEISS WD, HAYAKAWA T, WALTZ AG. Cortical neuronal function during ischemia: effects of occlusion of one middle cerebral artery on single unit activity in cats. *Arch Neurol* 1976; 33: 813-820.

HERNANDEZ MJ, VANUCCI RC, SALCEDO A, BRENNAN RW. Cerebral blood flow and metabolism during hypoglycemia in newborn dogs. *J Neurochem* 1980; 35: 622-628.

HERTZ MM, PAULSON OB, BARRY DI, CHRISTIANSEN JS, SVENDSEN PA. Insulin increases glucose transfer across the blood brain barrier in man. *J Clin Invest.* 1981; 67: 597-603.

HILLBOM ME, JONES AW. Hyperglycemia and brain damage. *Neurology* 1984; 34: 129.

HINDFELDT B. The prognostic significance of subfebrility and fever in the ischemic cerebral infarction. *Acta Neurol Scand.* 1976; 53: 72-79.

HOFER RE, LANIER WL. Effects of insulin on blood, plasma and brain glucose in hyperglycemic diabetic rats. *Stroke* 1991; 22: 505-509.

HOM FG, GOODNER CJ, BERRIE MA. A 3 H- 2 deoxyglucose method for comparing glucose metabolism and insulin responses among rat tissues in vivo.

Diabetes 1984; 33: 141-152.

HUDETZ Changes in regional cerebrovascular resistance during partial cerebral ischemia in rats. *Adv Exp Med Biol* 1985; 191: 111-120.

IBAYASHI S. The effect of long term antihypertensive treatment on medial hypertrophy of cerebral arteries in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 1986; 17: 515-519.

JARDON OM. Physiologic stress, heat stroke, malignant hyperthermia: a perspective. *Mil Med* 1982; 147:8-14.

JENSON ML, AUER RN. Ketamine fails to protect against ischemic neuronal necrosis in the rat. *Br J Anesth* 1988; 61: 206-210.

JERNIGAN J, EVANS OB, KIRSNER HS. Hyperglycemia and diabetes improve outcome in a rat model of anoxia ischemia. *Neurology* 1984; 34 (suppl 1): 262.

JONES T, MORAWETZ R, CROWELL R et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg.* 1981; 54: 773-782.

JORGENSEN H, NAKAYAMA H, RAASCHOU HO, OLSEN TS. Stroke in patients with diabetes. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 1994; 25: 1977-1984.

KADER A, BRISMAN M, MARAIRE N, HUH J, SOLOMON RA. The effect of mild hypothermia on permanent focal ischemia in the rat. *Neurosurgery* 1992; 31: 1056-1061.

KAGSTROM E, SMITH ML, SIESJÖ BK. Local cerebral blood flow in the recovery period following complete cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983a; 3: 170-182.

KAGSTROM E. Cerebral respiratory responses to hypercapnia in the recovery period following complete and incomplete cerebral ischemia in the rat. *Acta Physiol*

Scand 1983b; 118: 281-291.

KAHN K. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 1972; 22: 510-515.

KALIMO K, OLSSON Y. Effects of severe hypoglycemia on the human brain. Neuropathological case reports. *Acta Neurol Scand* 1980a; 62: 345-356.

KALIMO H, AGARDH CD, OLSSON Y, SIESJO BK. Hypoglycemic brain injury II. Electron microscopic findings in rat cerebral cortical neurons during profound insulin induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *Acta Neuropathol* 1980b; 50: 43-52.

KALIMO H, REHNCRONA S, SODERFELDT B et al. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: II Hystopathology. *J Cereb Blood Flow Metab*; 1981; 1: 313-327.

KANNEL WB, Mc GEE DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979; 241: 2035-2038.

KAPLAN B, BRINT S, TANABE J, JACEWICZ M, WANG XJ et al. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke* 1991; 22: 1032-1039.

KELLEHER JA, CHAN PH, CHAN TY, GREGORY GA. Modification of hypoxia-induced injury in cultured rat astrocytes by high levels of glucose. *Stroke* 1993; 24: 855-63.

KETY SS, WOODFORD RB, HARMEL MH et al. Cerebral blood flow and metabolism in schizophrenia: the effects of barbiturate semianarcosis, insulin coma and electroshock. *Am J Psychiat*. 1948; 104:765-770.

KEYKHAH MM, WELSH FA, HAGERDAL M, HARP JR. Reduction of the cerebral protective effect of hypothermia by oligemic hypotension during hypoxia

in the rat. *Stroke* 1982; 13: 171-174.

KIERS L, DAVIS SM, LARKINS R, HOPPER J, TRES B et al. Stroke topography and outcome in relation to hyperglycaemia and diabetes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 263-70.

KIESSLING M. Regional heterogeneity of L-[3-(3)H] tyrosine incorporation into rat brain proteins during severe hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1982; 2: 249-253.

KIESSLING M, AUER RN, KLEIHUES P, SIESJÖ BK. Cerebral protein synthesis during long term recovery from severe hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6: 42-51.

KIRINO T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239: 57-69.

KIRINO T, TSUJITA T, TAMURA A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991; 11: 299-307.

KITAMURA S, YAMAMOTO YL, HAKIM A et al. Patterns of physiological and biochemical changes in acute human cerebral infarction with and without hyperglycemia studied by positron emission tomography. *Am J Physiol Imaging* 1988; 3: 50.

KOIDE T, WIELOCH TW, SIESJÖ BK. Circulating catecholamines modulate ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1986; 6: 559-565.

KOUCHOUKOS NT, DAILY BB, WAREING TH, MURPHY SF. Hypothermic circulatory arrest for cerebral protection during combined carotid and cardiac surgery in patients with bilateral carotid artery disease. *Ann Surg* 1994; 219: 699-706.

KRAFT SA, LARSON P, SHUER LM, STEINBERG GK, BENSON BS, PEARL

RG. Effect of hyperglycemia on neuronal changes in a rabbit model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 1990; 21: 447-450.

KRAIG RP. Hydrogen ion buffering during complete brain ischemia. *Brain Res* 1985; 342: 281-290.

KROLICKI L, LENIGER-FOLLERT E. Oxygen supply of the rat brain cortex during severe hypoglycemia. *Pflügers Arch* 1980; 387:121-126.

KULUZ JW, GREGORY GA, YU AC, CHANG Y. Selective brain cooling during and after prolonged global ischemia reduces cortical damage in rats. *Stroke*. 1992; 23: 1792-6.

KUROIWA T, BONNEKOH P, HOSSMANN KA. Therapeutic window of halothane anesthesia for reversal of delayed neuronal injury in gerbils: relationship to postischemic motor hyperactivity. *Brain Res* 1991; 563:33-38.

KURTZKE JF. Epidemiology of cerebrovascular disease. En: Mc DOWELL FH, CAPLAN LR (eds.) *Cerebrovascular survey report for the national institute for neurological and communicative disorders and stroke*. NINCDS, Bethesda, 1985; pp 1-34.

KUSHNER M, NENCINI P, REIVICH M, RANGO M, JAMIESON E et al. Relation of hyperglycemia early in ischemic brain infarction to cerebral anatomy, metabolism and clinical outcome. *Ann Neurol*. 1990; 28: 129-135.

KUUSISTO J, MYKKÄNEN L, PYÖRÄLÄ K, LAAKSO M. Non insulin dependent diabetes and its metabolic control are important predictors of stroke in elderly subjects. *Stroke* 1994; 25: 1157-1164.

LANKS KW. Inhibition of glucose-regulated and heat shock protein induction by low temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1034: 62-66.

LAPTOOK AR, CORBETT RJT, NUNNALLY RL. Effect of plasma glucose

concentration on cerebral metabolism during partial ischemia in neonatal pigs. *Stroke* 1990; 21: 435-440.

LE BLANC MH, HUANG M, DAKSHA P et al. Glucose given after hypoxic ischemia does not affect brain injury in piglets. *Stroke* 1994; 25: 1443-1448.

LENIGER-FOLLERT E. Regulation of microflow in the cat brain during insulin induced hypoglycemia. *Adv Exp Med Biol* 1984; 169: 297-303.

LE MAY DR, GEHUA L, ZELENOCK GB, D'ALECY LG. Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1988; 19: 1411-1419.

LEVINE SR, WELCH KM, HELPERN JA, CHOPP M, BRUCE R et al. Prolonged deterioration of ischemic brain energy metabolism and acidosis associated with hyperglycemia: human cerebral infarction studied by serial ³¹P NMR spectroscopy. *Ann Neurol* 1988; 23: 416-418.

LEWIS LD, LJUNGGREN B, RATCHESON RA, SIESJÖ BK. Cerebral energy state in insulin induced hypoglycemia related to blood glucose and to EEG. *J Neurochem.* 1974; 23: 673-679.

LIBBY P, MAROKE PR, BRAUNWALD E. The effect of hypoglycemia on myocardial ischemic injury during acute experimental coronary artery occlusion. *Circulation* 1975; 51: 621-626.

LITTLE JR, SUNDT TM, KERR FWL. Neuronal alterations in developing cortical infarction. An experimental study in monkeys. *J Neurosurg.* 1974; 39: 186-198.

LJUNGGREN B, NORBERG K, SIESJÖ BK. Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. *Brain Res.* 1974; 77: 173.

LO EH, STEINBERG GK. Effects of hypothermia on evoked potentials, magnetic

resonance imaging, and blood flow in focal ischemia in rabbits. *Stroke* 1992; 23: 889-93.

LOCKWOOD AH, BOGUE L, YAP E, BERRIDGE M. Increased glucose metabolism causes cerebral acidosis during hypoxia. *Ann Neurol* 1986; 20: 155.

LONGSTRETH WT Jr, DIEHR P, COBBS LA, HANSON RW, BLAIR AD. Neurologic outcome and blood glucose levels during out of hospital cardiopulmonary resuscitation. *Neurology* 1986; 36:1186-1191.

LUCIGNIANI P, NAMBA H, NEHLIG A, PORRINO LJ, KENNEDY C et al. Effect of insulin on local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987; 7: 309-314.

LUNDGREN J, MANS A, SIESJÖ BK. Ischemia in normo and hyperglycemic rats: plasma energy substrates and hormones. *Am J Physiol.* 1990; 258: E767-E774.

LUNDY EF. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. *J Pharmacol Methods* 1986; 16: 201-214.

LYONS BE, OBANA WG, BORCICH JK, KLEINMAN R et al. Chronic histological effects of ultrasonic hyperthermia on normal feline brain tissue. *Radiat Res* 1986; 106: 234-251.

MABE H, BLOMQUIST P. Intracellular pH in the brain following transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983; 3: 109-114.

MARSALA M, VANICKY I, YAKSH TL. Effect of graded hypothermia (27 to 34 °C) on behavioural function, hystopathology, and spinal blood flow after spinal ischemia in the rat. *Stroke* 1994; 25: 2038-2046.

MATCHAR DB, DIVINE GW, HEYMAN A, FEUSSNER JR. The influence of hyperglycemia on outcome of cerebral infarction. *Ann Intern Med* 1992; 117:449-56

MATSUMOTO M, SCHELLER MS, ZORNOW MH, STRNAT MA. Effect of S-emopamil, nimodipine, and mild hypothermia on hippocampal glutamate concentrations after repeated cerebral ischemia in rabbits. *Stroke*. 1993; 24: 1228-34.

MC CALL, FIXMAN LB, FLEMING L, TORNHEIM K, CHICK W et al. Chronic hypoglycemia increases brain glucose transport. *Am J Physiol* 1986; 251 (4Pt 1): E441-447.

MEDEN P, OVERGAARD K, PEDERSEN H, BOYSEN G. The influence of body temperature on infarct volume and thrombolytic therapy in a rat embolic stroke model. *Brain Res*. 1994; 647: 131-138.

MELAMED E. Reactive hyperglycemia on patients with acute stroke. *J Neurol Sci*. 1976; 29:267-275.

MEMEZAWA H, SMITH ML, SIESJO BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1992; 23:552-559.

MEYER JS, PORTNOY HS. Localized cerebral hypoglycemia simulating stroke. *Neurology* 1958; 8: 601-614.

MICHENFELDER JD, SUNDT TM Jr. Cerebral ATP and lactate levels in the squirrel monkey following occlusion of the middle cerebral artery. *Stroke* 1971; 2: 319-326.

MICHENFELDER JD, MILDE JH. Failure of prolonged hypocapnia, hypothermia or hypertension to favorably alter acute stroke in primates. *Stroke* 1977; 8: 87-91.

MICHENFELDER JD. The hypothermic brain. En: *Anesthesia and the brain*. Cap. 2, pp: 22-34; New York, Churchill Livingstone Inc., 1988.

MICHENFELDER JD, MILDE JH. The effects of profound levels of hypothermia

(below 14 °C) on canine cerebral metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12: 877-80.

MINAMISAWA H, SMITH ML, SIESJO BK. The effect of mild hyperthermia (39° C) and hypothermia (35° C) on brain damage following 5, 10 and 15 min of forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1990; 28: 26-33.

MITANI A, KATOAKA K. Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain micodialisys study. *Neuroscience* 1991; 42: 661-670.

MOCHIZUKI H, TOBITA M, KOGURE K. Oclusión súbita de una arteria cerebral. En CHOPRA JS et al., eds. *Progress in cerebrovascular disease. Current concepts in stroke and vascular dementia.* Elsevier. 1991.

MOHR JP, CAPLAN LR, MELSKI JW et al. The Harvard Cooperativ Stroke Registry: a prospective registry of cases hospitalized with stroke. *Neurology* 1978; 28: 754-621.

MORIKAWA E, GINSBERG ME, BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MYT et al. Moderate cerebral hypothermia fails to amelirate focal ischemic injury. *Stroke* 1991; 22: 130.

MORIKAWA E, GINSBERG MD, DIETRICH D et al. The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: hystopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12: 380-389.

MOYER DJ, WELSH FA, ZAGER EL. Spontaneous cerebral hypothermia diminishes focal infarction in rat brain. *Stroke* 1992; 23: 1812-6.

MRSUJULA BJ. Hystochemical investigation of the mongolian gerbil's brain during unilateral ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1979; 46: 123-131.

MUJSCE DJ, TOWFIGHI J, HEITJAN DF, VANNUCCI RC. Differences in

intraischemic temperature influence neurological outcome after deep hypothermic circulatory arrest. *Stroke* 1994; 25: 1433-1442.

MURROS K, FOGELHOLM R, KETTUNEN S, VUORELA AL, VALVE J. Blood glucose, glycosylated haemoglobin, and outcome of ischemic brain infarction. *J Neurol Sci.* 1992; 111: 59-64.

MURROS K, FOGELHOLM R, KETTUNEN S, VUORELA AL, VALVE J. Serum cortisol and outcome of ischemic brain infarction. *J Neurol Sci.* 1993; 116: 12-7.

MYERS RE, YAMAGUCHI S. Nervous system effects of cardiac arrest in monkeys. *Arch Neurol.* 1977; 34: 65-74.

MYERS RE, NORRIS JV, HACHINSKY VC. Plasma norepineprine in stroke. *Stroke* 1981; 12: 200-204.

MYERS RE, DE COURTEN-MYERS G, SCHOOLFIELD L. Increased mortality from hemispherical edema from release of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1987; 18: 297.

NAKAI H, YAMAMOTO YL, DIKSIK M et al. Triple tracer autoradiography demonstrates effects of hyperglycemia on cerebral blood flow, pH and glucose utilization in cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1988; 19: 764-772.

NATALE JA, D'ALECY LG. Protection from cerebral ischemia by brain cooling without reduced lactate accumulation in dogs. *Stroke* 1989; 20: 770-777.

NEIL HAW, GALE EAM, HAMILTON SJC, LOPEZ-ESPINOZA I, KAURA R, McCARTHY ST. Cerebral blood flow increases during insulin induced hypoglycemia in type I (insulin dependent) diabetic patients and control subjects. *Diabetologia* 1987; 30: 305-309.

NERDEGAARD M, ASTRUP J. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct

current potential and [¹⁴C]-²Deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986; 6: 607-615.

NERDEGAARD M, GJEDDE A, DIEMER NH. Hyperglycemia protects against neuronal injury around experimental brain infarcts. *Neurol Res.* 1987a; 9: 241-244.

NERDEGAARD M, DIEMER NH. Focal ischemia of the rat brain, with special reference to the influence of plasma glucose concentration. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1987b; 73:131-137.

NERDEGAARD M. Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Res* 1987c; 408: 79-85.

NILSSON B, AGARDH CD, INGVAR M, SIESJÖ BK. Cerebrovascular response during and following insulin-induced hypoglycemia: CO₂ sensitivity, autoregulation and influence of prostaglandin synthesis inhibition. *Acta Physiol Scand.* 1981; 111: 455-463.

NISHIGAYA K, YOSHIDA Y, SASUGA M, NUKUI H, OONEDA G. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in the rat brain. *Stroke* 1991; 22: 635-642.

NORBERG K, SIESJÖ BK. Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin induced hypoglycemia. *J Neurochem* 1976; 26: 345-352.

NOWAK TS Jr. Effects of amphetamine on protein synthesis and energy metabolism in mouse brain: role of drug-induced hyperthermia. *J Neurochem.* 1988; 50: 285-294.

NOWAK TS. Localization of 70 kDa stress protein mRNA induction in gerbil brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; 11: 432-439.

OGURA K, TAKAYASU M, DACEY RG. Effects of hypothermia and

hyperthermia on the reactivity of rats intracerebral arterioles in vitro. *J Neurosurg.* 1991; 75: 433-439.

OKU K, STERZ F, SAFAR P, JOHNSON D, OBRIST W et al. Mild hypothermia after cardiac arrest in dogs does not affect postarrest multifocal cerebral hypoperfusion. *Stroke* 1993; 24: 1590-1597.

OLIVERAS V. Mortalidad y morbilidad cardiovascular (cardiopatía isquémica y accidentes cerebrovasculares) en España. *Med Clin.* 1987; 88: 786-787.

O'NEILL I, DAVIES I, FULLERTON KJ, BENNET D. Stress hormone and blood glucose response following acute stroke in the elderly. *Stroke* 1991; 22: 8842-847.

ONESTI ST, BAKER CJ, SUN PP et al. Transient hypothermia reduces focal ischemic brain injury in the rat. *Neurosurgery* 1991; 29: 369-373.

OOMURA Y, KITA H. Insulin acting as a modulator of feeding through the hypothalamus. *Diabetologia* 1981; 20: 290-298.

OPPENHEIMER SM, HOFFBRAND BI, OSWALD GA, YUDKIN JS. Diabetes mellitus and early mortality from stroke. *Br Med J* 1985; 291: 1014-1015.

OWEN OE, MORGAN AP, KEMP HG, SULLIVAN JM, HERRERA MG et al. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest.* 1967; 46: 1589-1595.

PACOLD ST, BLACKARD WG. Central nervous system receptors in normal and diabetic rats. *Endocrinology* 1979; 105: 1452-1457.

PANJAWI GD, MUSTAFA MK, MUHAILAN A, ANEJA IS, OWUNWANNE A. Effect of hyperthermia on somatosensory evoked potentials in the anaesthetized rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1991; 80: 384-391.

PALJARVI L, SÖDERFELDT B, KALIMO H, OLSSON Y, SIESJÖ BK. The brain in extreme respiratory acidosis. A light and electron microscopic study in the rat.

Acta Neuropathol. (Berl) 1982; 58:87-94.

PASCHEN W, SIESJÖ BK, INGVAR M, HOSSMAN KA. Regional differences in brain glucose content on graded hypoglycemia. *Neurochem Pathol.* 1986; 5: 131-142.

PEINADO G, OZAITA G, ANTIGUEDAD A, CALANDRE L, BERMEJO F. La glucemia como factor pronostico en el infarto cerebral. *Neurologia* 1984; 3: 50-53.

PELLIGRINO LJ, CUSHMAN AJ. A stereotaxic atlas of the rat brain. Plenum Press. New York. 1979.

PELLIGRINO D, ALMQUIST LO, SIESJÖ BK. Effect of insulin induced hypoglycemia on intracellular pH and impedance in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res* 1981; 221: 129-147.

PLUM F. What causes cerebral infarction in the ischemic brain?. The Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 1982; 3: 222-233.

POWER MJ, FULLERTON KJ, STOUT RW. Blood glucose and prognosis of acute stroke. *Age Aging* 1988; 17: 164-170.

POWERS WJ, GRUBB RL, DARRIET D, RAICHLE ME. Cerebral blood flow and cerebral metabolic rate of oxygen requirements for cerebral function and viability in humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1985; 5: 600-608.

POWERS WJ. Hemodynamics and metabolism in ischemic cerebrovascular disease. En: BARNETT HJM, HACHINSKI VC (Eds.). *Neurologic clinics* 1992; 10 (1): 31-48. Cerebral ischemia: treatment and prevention. Saunders WB.

PRADO R, GINSBERG MD, ALONSO OF, DIETRICH WD, BUSTO R et al. Hyperglycemia increases infarct size in collaterally perfused but not end arterial vascular territories: result in two thrombotic stroke models. *Neurology* 1987; 37 (Suppl 1): 131.

PROUGH DS, STUMP DA, ROY RC, GRAVLEE GP, WILLIAMS T et al. Response of cerebral blood flow to changes in carbon dioxide tension during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 1986; 64: 576-581.

PULSINELLI WA, WALDMAN S, RAWLINSON D, PLUM F. Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 1982a; 32: 1239-1246.

PULSINELLI WA, BRIERLY JB, PLUM F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982b; 11: 491-498.

PULSINELLI WA, LEVY DE, DUFY TE. Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982c; 11: 499-509.

PULSINELLI WA, DUFFY TE. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem*. 1983a; 40:1500-1503.

PULSINELLI WA, LEVY DE, SIGSBEE B, SCHERER P, PLUM F. Increased damage after ischemic stroke in patients with hyperglycemia with or without established diabetes mellitus. *Am J Med*. 1983c; 74:540-544.

PULSINELLI WA, JACEWICZ M. Animal models of brain ischemia. En: *Stroke. Pathophysiology, diagnosis and management*. BARNETT HJM et al., editores. 1992; 1: 49-67. Churchill Livingstone, Nueva York.

RATCHESON RA, BLANK AC, FERRENDELLI JA. Regionally selective metabolic effects of hypoglycemia in brain. *J Neurochem* 1981; 36: 1952-1958.

REHNCRONA S, ROSEN I, SIESJO BK. Excessive cellular acidosis: an important mechanism of neuronal damage in the brain?. *Acta Physiol Scand*. 1980; 110: 435-437.

REHNCRONA S, ROSEN I, SIESJÖ BK. Brain lactic acidosis and ischemic cell

damage: 1-Biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1: 297-311.

REHNCRONA S, WESTERBERG E, AKESSON B, SIESJÖ BK. Brain cortical fatty acids and phospholipids during and following complete and severe incomplete ischemia. *J Neurochem.* 1982; 38:84-93.

RIDDLE MC, HART J. Hyperglycemia recognized and unrecognized as a risk factor for stroke and TIA. *Stroke* 1982; 13: 356-359.

RIDENOUR TR, WARNER DS, TODD MM, Mc ALLISTER AC. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats. *Stroke* 1992; 23: 733-738.

ROBERTSON C, GOODMAN JC, GROSSMAN RG et al. Dietary nonprotein calories and cerebral infarction size in rats. *Stroke* 1992; 23: 564-568.

ROBERTSON C, GROSSMAN RG. Protection against spinal cord ischemia by insulin-induced hypoglycemia. *J Neurosurg* 1987; 23: 564-568.

ROSENBERG GA, WHITE J, GASPAROVIC C, CRISOSTOMO EA, GRIFFEY RH. Effect of hypoxia on cerebral metabolites measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Stroke* 1991; 22: 73-79.

ROSOMOFF HL. Hypothermia and cerebral vascular lesions: II. Experimental interruption followed by induction of hypothermia. *Arch Neurol Psychiatry* 1957; 78: 454-464.

RÖTHER J, SCREINER A, WENTZ KU, HENNERICI M. Hypoglycemia presenting as basilar artery thrombosis. *Stroke* 1992; 23: 112-113.

SAKO K, KOBATAKE K, YAMAMOTO YL, DIKSIC M. Correlation of local cerebral blood flow, glucose utilization and tissue pH following a middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 1985; 16: 828-834.

SANDBERG M. Metabolically derived aspartate. Elevated extracellular levels in vivo in iodoacetate poisoning. *J Neurosci Res.* 1985; 13: 489-495.

SHIH CJ, LIN MT, TSAI SH. Experimental study on the pathogenesis of heat stroke. *J Neurosurg.* 1984; 60: 1246-1252.

SHUAIB A, SOCHOCKA E, ISHAQZAY R, HERTZ L, CODE WE. Protective effect of hypothermia during ischemia in neural cell cultures. *Neurochem Res* 1993; 18: 663-5.

SIEBER FE, KOEHLER RC, BROWN R et al. Diabetic chronic hyperglycemia and cerebral pH recovery following global ischemia in dogs. *Stroke* 1994; 25: 1449-1455.

SIEMKOWICZ E, HANSEN A. Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-,normo-,and hyperglycemic rats. *Acta Neurol Scand.* 1978; 58: 1-8.

SIEMKOWICZ E. Hyperglycemia in the reperfusion period hampers recovery from cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand.* 1981a; 64: 207-216.

SIEMKOWICZ E, HANSEN J. Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 min. ischemia in normo and hyperglycemic rats. *Stroke* 1981b; 12: 236-240.

SIEMKOWICZ E. Brain uptake of mannitol and sucrose after cerebral ischemia: effect of hyperglycemia. *Acta Physiol Scand.* 1981c; 112: 359-363.

SIEMKOWICZ E, HANSEN AJ, GJEDDE A. Hyperglycemic ischemia of rat brain: the effect of postischemic insulin on metabolic rate. *Brain Res.* 1982; 243: 386-390.

SIESJÖ BK. *Brain energy metabolism.* J S Wiley. New York. 1978.

SIESJÖ BK, INGVAR M, PELLIGRINO D. Regional differences in vascular autoregulation in the rat brain in severe insulin induced hypoglycemia. *J Cereb*

Blood Flow Metab 1983; 3: 478-485.

SIESJÖ BK, WIELOCH T. Cerebral metabolism in ischemia: neurochemical basis for therapy. Br J Anesthesiol. 1985; 57:47-62.

SIESJÖ BK, AGARDH CD, BENGTSSON F. Free radicals and brain damage. Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1989; 1: 9-20.

SIESJÖ BK, EKHOLM A, KATSURA K, THEANDER S. Acid-base changes during complete brain ischemia. Stroke 1990; 21 (Suppl III): III-194 - III-199.

SIMON RP, SCHMIDLEY JW, MELDRUM BS, SWAN JH, CHAPMAN G. Excitotoxic mechanisms in hypoglycemic hippocampal injury. Neuropathol Appl Neurobiol. 1986a; 12: 567-576.

SIMON RP, SCHMIDLEY JW, MELDRUM BS, SWAN JH, CHAPMAN AG. Excitatory amino acid and calcium content of subarachnoid spinal fluid during hypoglycemia in the rat. Neurosci Letter 1986b; 71: 370-374.

SIMON RP, SCHMIDLEY JW, SWAN JH, MELDRUM BS. Neuronal alterations in the hippocampus following severe hypoglycemia: a light microscopic study and ultrastructural study in the rat. Neuropathol Appl Neurobiol. 1986c; 12:11-26.

SINGH AK, BERT AA, FENG WC, ROTENBERG FA. Stroke during coronary artery bypass grafting using hypothermic versus normothermic perfusion. Ann Thorac Surg. 1995; 59: 84-9.

SMITH ML, VON HANWHER R, SIESJÖ BK. Changes in extra and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. J Cereb Blood Flow Metab. 1986; 6: 574-583.

STEEN PA, SOULE EH, MICHENFELDER JD. Detrimental effect of prolonged hypothermia in cats and monkeys with and without regional cerebral ischemia. Stroke 1979a; 10: 522-529.

STEEN PA, MILDE J, MICHENFELDER JD. The detrimental effects of prolonged hypothermia and rewarming in the dog. *Anesthesiology* 1980; 52: 224-230.

STEEN PA, NEWBERG LA, MILDE JH, MICHENFELDER JD. Hypothermia and barbiturates: individual and combined effects on canine cerebral oxygen consumption. *Anesthesiology* 1983; 58: 527.

STERNAU L, DIETRICH WD, BUSTO R, KRAYDIEH S. Barbiturates fail to protect the normothermic brain from ischemic injury. *Stroke* 1991; 22: 129.

STRONG AJ, MILLER SA, WEST IC. Protection of respiration of a crude mitochondrial preparation in cerebral ischemia by control of blood glucose. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1985; 48: 450-454.

STRONG AJ, FAIRFIELD JE, MONTEIRO E, KIRBY M, HOGG AR, et al. Insulin protects cognitive function in experimental stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990, 53: 847-853.

STROSZNAJDER J. Effect of hypoglycemia on the brain free fatty acid level and the uptake of fatty acids by phospholipids. *Neurochem Res.* 1984; 9: 465-476.

SUNDT TM. Experimental cerebral infarction: retroorbital extradural approach for occluding the middle cerebral artery. *Mayo Clin Proc.* 1966; 41: 151-168.

SUNDT TM, MICHENFELDER JD. Focal cerebral transient ischemia in the squirrel monkey: effect on ATP and lactate levels with electrocorticographic and pathologic correlation. *Circ Res.* 1972; 30: 703-712.

SUTHERLAND GR, PEELING J, SUTHERLAND E, TYSON R, DAI F et al. Forebrain ischemia in diabetic and nondiabetic BB rats studied with ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Diabetes* 1992; 41: 1328-34.

SUTTON LN, CLARK BJ, NORWOOD CR, WOODFORD EF, WELSH FA.

Global cerebral ischemia in piglets under conditions of mild and deep hypothermia. *Stroke* 1991; 22: 1567-1573.

SYMON L, BRANSTON NM, STRONG AJ, HOPE TD. The concepts of thresholds of ischemia in relation to brain structure and function. *J Clin Path.* 30 (Suppl) 1977; 11:149-154.

TAMURA A, GRAHAM DI, MC CULLOGH J, TEASDALE GM. Focal cerebral ischemia in the rat: 1-Description of the technique and early pathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981a; 1: 53-60.

TAMURA A, GRAHAM DI, MC CULLOGH J, TEASDALE GM. Focal cerebral ischemia in the rat. 2- Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981b; 1: 61-69.

TAYLOR CP, WEBER ML. Effect of temperature on synaptic function after reduced oxygen and glucose in hippocampal slices. *Neuroscience* 1993; 52: 555-562.

TING P. Influence of blood brain barrier opening to proteins on developing postischemic brain injury. *Neurol Res.* 1986; 8:146-151.

TISHERMAN SA, SAFAR P, RADOVSKY A et al. Profound hypothermia (<10 °C) compared with deep hypothermia (15 °C) improves neurologic outcome in dogs after two hours circulatory arrest induced to enable resuscitative surgery. *J Trauma* 1991; 30: 1051-1062.

TONI D, De MICHELE, FIORELLI M, BASTIANELLO S, CAMERLINGO M et al. Influence of hyperglycemia on infarct size and clinical outcome of acute ischemic stroke patients with intracranial arterial occlusion. *J Neurol Sci.* 1994; 123: 129-133.

TOPIC E, PAVLICEK I, BRINAR V, KORSIC M. Glycosylated haemoglobin in clarification of the origin of hyperglycaemia. *Diab Med.* 1989; 6: 12-15.

TRACEY F, CRAWFORD VL, LAWSON JT, BUCHANAN KD, STOUT RW. Hyperglycaemia and mortality from acute stroke. *Q J Med.* 1993; 439-446.

TROJABORG W, BOYSEN G. Relation between EEG, regional cerebral blood flow and internal carotid artery pressure during carotid endarterectomy. *Electroencephalogr and Clinical Neurophysiol.* 1973; 34: 61-69.

TYSON GW, TEASDALE GM, GRAHAM DI, McCULLOH J. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and hystopathological changes. *Ann Neurol.* 1984; 15: 559-567.

UCHINO H, LUNDGREN J, SMITH M-L, SIESJÖ BK. Preischemic hyperglycemia leads to delayed postischemic hyperthermia. *Stroke* 1994; 25: 1824-1829.

VACANTI FX, AMES A. Mild hypothermia and Mg^{2+} protect against irreversible damage during CNS ischemia. *Stroke* 1984; 15: 695-698.

VAN KOOTEN F, HOOGERBRUGGE N, NAARDING P, KOUDSTAAL PJ. Hyperglycemia in the acute phase of stroke is not caused by stress. *Stroke* 1993; 24: 1129-1132.

VAZQUEZ CRUZ J, MARTI-VILALTA JL, FERRER I, PEREZ-GALLOFRE A, FOLCH J. Progressing cerebral infarction in relation to plasma glucose in gerbils. *Stroke* 1990a; 21: 1621-1624.

VAZQUEZ CRUZ J, ALVAREZ SABIN J. Efecto de la glucemia en la isquemia cerebral. *Rev Neurol. (Barcelona)* 1990b; 92: 153-155.

VENABLES GS, MILLER SA, GIBSON G, HARDY JA, STRONG AJ. The effects of hyperglycaemia on changes during reperfusion following focal cerebral ischemia in the cat. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1985; 48: 663-669.

VOLL CL, AUER RN. The effect of postischemic blood glucose levels on ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1988; 24: 638-646.

VOLL CL. Postischemic insulin reduces spatial learning deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1989; 20:646-651.

VOLL CL, AUER RN. Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; 11: 1006-1014.

WALLIS WE, DONALDSON I, SCOTT RS, WILSON J. Hypoglycemia masquerading as cerebrovascular disease (hypoglycemic hemiplegia). *Ann Neurol.* 1985; 18: 510-512.

WARNER DS, SMITH ML, SIESJÖ BK. Ischemia in normo and hyperglycemic rats: effects on brain water and electrolytes. *Stroke* 1987; 18: 464-471.

WARNER DS, GIONET TX, TODD MM, Mc ALLISTER AM. Insulin-induced normoglycemia improves ischemic outcome in hyperglycemic rats. *Stroke* 1992; 23: 1775-80.

WEINRAUCH V, SAFAR P, TISHERMAN S, KUBOYAMA K, RADOVSKY A. Beneficial effect of mild hypothermia and detrimental effect of deep hypothermia after cardiac arrest in dogs. *Stroke* 1992; 23: 1454-1462.

WELCH MA, LEVINE SR, MARTIN G et al. Magnetic resonance spectroscopy in cerebral ischemia. En: BARNETT HJM, HACHINSKI VC (Eds.). *Neurologic clinics* 1992; 10(1): 1-29. *Cerebral ischemia: treatment and prevention.* Saunders WB.

WELSH FA. Correlation between glucose utilization and metabolite levels during focal ischemia in the cat brain. *Stroke* 1980; 11: 79-84.

WELSH FA, MC KEE A. Effects of glucose pretreatment on recovery of ATP and cerebral blood flow following unilateral hypoxia ischemia in the mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983; 3(suppl 1): 377-378.

WELSH FA, SIMS RE, HARRIS VA. Mild hypothermia prevents ischemic injury

in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990; 10: 557-563.

WELSH FA, HARRIS VA. Postischemic hypothermia fails to reduce ischemic injury in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991; 11: 617-620.

WHITE BC, GROSSMAN LI, KRAUSE GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion. *Neurology* 1993; 43:1656-1665.

WIELOCH T. Hypoglycemia induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 1985; 230: 681-683.

WOJAK JC, DE CRESCITO V, YOUNG W. Basilar artery occlusions in rats. *Stroke* 1991; 22: 247-252.

WOO J, MA JT, ROBINSON JD et al. Hyperglycemia is a stress response in acute stroke. *Stroke* 1988; 19: 1359-1364.

WOO J, LAM CWK, KAY R, WONG AHY, TEOH R et al. The influence of hyperglycemia and diabetes mellitus on immediate and 3 month morbidity and mortality after acute stroke. *Arch Neurol* 1990; 47: 1174-1177.

XUE D, BUCHAN AM. Moderate hypothermia prevents focal infarction. *Stroke* 1991; 22: 129.

YAMASHITA K, EGUCHI Y, KAJIWARA K, ITO H. Mild hypothermia ameliorates ubiquitin synthesis and prevents delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Stroke* 1991; 22: 1574-1581.

YIP PK, HE YY, HSU CY et al. Effect of plasma glucose on infarct size in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neurology* 1991; 41: 899.

YOUNG RS, OLEGINSKY TP, YAGEK SK, TOWFIGHI J. The effect of graded hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage: a neuropathologic study in the neonatal rat. *Stroke* 1983; 14: 929-934.

ZASSLOW MA, PEARL RG, SHUER LM, STEINBERG GK, LIEBERSON RE et al. Hyperglycemia decreases acute neuronal ischemic changes after middle cerebral artery occlusion in cats. *Stroke* 1989; 20: 519-523.

ZHANG RL, CHOPP M, CHEN H, GARCIA JH, ZHANG ZG. Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1993; 24: 1235-40.