

GUÍA NEUROLÓGICA 8

ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

CAPÍTULO 1

FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

MARÍA ALONSO DE LECIÑANA

SERVICIO DE NEUROLOGÍA. UNIDAD DE ICTUS.
HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL.
MADRID.

CORRESPONDENCIA:

e-mail: malonsoc.hrc@salud.madrid.org

INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral es un fenómeno complejo y dinámico. Si bien la isquemia tiene lugar de manera abrupta, las alteraciones moleculares que se producen en las células (tanto en neuronas como en glía y en elementos vasculares de la microcirculación en la zona afectada) ocurren de manera secuencial a lo largo de un tiempo que depende de la gravedad de la isquemia, de que ésta sea permanente o transitoria y de que se apliquen o no medidas terapéuticas dirigidas proteger el tejido afectado. Conocer cuáles son los trastornos fisiopatológicos responsables del daño por isquemia cerebral, así como su perfil temporal, es fundamental para poder aplicar tratamientos eficaces, farmacológicos o no farmacológicos, que protejan el tejido cerebral de los efectos deletéreos de la isquemia. En este conocimiento y en el desarrollo de diversos fármacos y estrategias neuroprotectoras se ha avanzado considerablemente en las últimas décadas (1-3).

La isquemia cerebral focal resulta de la interrupción del flujo sanguíneo regional a causa de la oclusión de una determinada arteria, por mecanismo tromboembólico, o bien hemodinámico (4-6). Conocer la etiología determinará la estrategia más adecuada para la prevención secundaria. Independientemente de la etiología, la isquemia cerebral focal da lugar al ataque cerebrovascular vascular (Ictus-ACV) isquémico o infarto cerebral cuando es permanente o al ataque isquémico transitorio (AIT), cuando no lo es (4,6).

Teniendo en cuenta que el tejido cerebral es dependiente del aporte adecuado de oxígeno y glucosa para su funcionamiento normal, el cese del mismo ocasionará diversas alteraciones funcionales que conducirán finalmente a la muerte celular. Las manifestaciones clínicas dependerán de la arteria afectada y de la extensión de tejido lesionado. A lo largo de este capítulo se resumen los trastornos que conducen al desarrollo de un infarto cerebral como consecuencia de una isquemia focal; con el fin de presentarlos de manera que permitan al neurólogo clínico comprender las bases de las distintas estrategias neuroprotectoras frente a la isquemia. Esquematizar estos mecanismos fisiopatológicos de manera que su explicación resulte sencilla y de utilidad, supone necesariamente incurrir en una excesiva simplificación. No debemos olvidar que todos estos trastornos se desencadenan de manera secuencial, pero no necesariamente “organizada” ni “rígida” y que en función de distintas intervenciones o circunstancias se puede modificar la expresión e importancia relativa de alguno de los mediadores de lesión frente a otros, ya que todos están relacionados entre ellos a través de distintas vías de señalización.

Por último es necesario indicar que aquellas variables biológicas implicadas en el mantenimiento de una adecuada homeostasis (tensión arterial, glucemia, temperatura, oximetría) influyen de manera importante en todos los mecanismos responsables del desarrollo de un infarto cerebral (2,7).

LA PENUMBRA ISQUÉMICA. EL CONCEPTO DE TEJIDO SALVABLE

La isquemia cerebral focal se traduce, en el territorio irrigado por la arteria afectada, en distintos grados de reducción de flujo sanguíneo cerebral regional (FSC) (8), que dependen de factores hemodinámicos, fundamentalmente de la existencia de circulación colateral eficaz y del mantenimiento de una adecuada presión arterial, ya que en el tejido isquémico, debido a la lesión de las células endoteliales y de las células musculares lisas de la pared arterial como consecuencia

de la isquemia, se pierden los mecanismos normales de regulación de la circulación cerebral y la presión de perfusión se hace dependiente de la presión arterial.

Teniendo en cuenta que existen unos umbrales de flujo a partir de los cuales se van perdiendo las funciones celulares (9-12), podemos entender que existirán áreas de tejido sometidas a mayor grado de isquemia, como son aquellas que dependen estrictamente de la arteria afectada, con ausencia total o casi total de FSC, así como las zonas más susceptibles, que sufrirán, de manera prácticamente inmediata, la muerte de todas las estirpes celulares. Esta zona se denomina core del infarto y en ella, debido a la carencia de oxígeno y glucosa y a la consiguiente depleción energética, se produce la pérdida de función de membrana y de homeostasis iónica que conduce a la muerte celular (13,14).

Alrededor de esta zona de infarto y dependiendo de los factores hemodinámicos mencionados, puede existir flujo sanguíneo residual suficiente para mantener la viabilidad celular, aunque no su función normal, durante un tiempo determinado que dependerá de la magnitud de dicha perfusión residual. Esta zona transitoriamente viable, denominada área de penumbra isquémica (8,9,11,12), es susceptible de recuperación si la hipoperfusión y las alteraciones que ésta produce se corrigen y por tanto es la diana de las medidas terapéuticas dirigidas a reducir la lesión y las secuelas tras la isquemia cerebral focal (13-15). De continuar la situación de hipoperfusión, las alteraciones bioquímicas que resultan del trastorno de la función celular, denominadas cascada isquémica, terminarán provocando la pérdida irreversible de la viabilidad celular y causando su muerte (16-18).

La restauración del FSC, es el primer paso lógico en el tratamiento de la isquemia, pero se ha podido comprobar que si esta normalización no se produce con relativa rapidez, la reperusión no resulta suficiente para inhibir los mediadores de la cascada isquémica e incluso puede potenciarlos (19), facilitando la progresión de la lesión hasta la muerte celular y la extensión del área de infarto (16-18). Se ha comprobado además que existen fenómenos de muerte neuronal retrasada, hasta varios días después de la isquemia, aunque se produzca la reperusión eficaz. En este fenómeno se han implicado los mecanismos de muerte por apoptosis (20).

MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Existen dos mecanismos fundamentales de muerte celular tras la exposición a fenómenos nocivos: la necrosis y la apoptosis. En el caso de la isquemia cerebral, hay evidencia de que se desencadenan ambos procesos. Los dos tipos de muerte se distinguen por marcadores morfológicos y también bioquímicos puesto que los mecanismos que las producen son diferentes (21,22).

La muerte celular por necrosis es un fenómeno pasivo que depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de enzimas líticas constitutivas que destruyen componentes celulares (13,14,23). Como consecuencia de la depleción de energía se produce el fracaso de la función de membrana con pérdida del gradiente iónico y paso de agua al interior del citoplasma y las organelas con el consiguiente edema celular. Finalmente tiene lugar la lisis de las membranas y la pérdida de la diferenciación de los compartimentos celulares (Figura 1). La lisis celular y la liberación del contenido citoplásmico ocasionan una respuesta inflamatoria con infiltración de leucocitos neutrófilos y macrófagos. Al microscopio óptico las

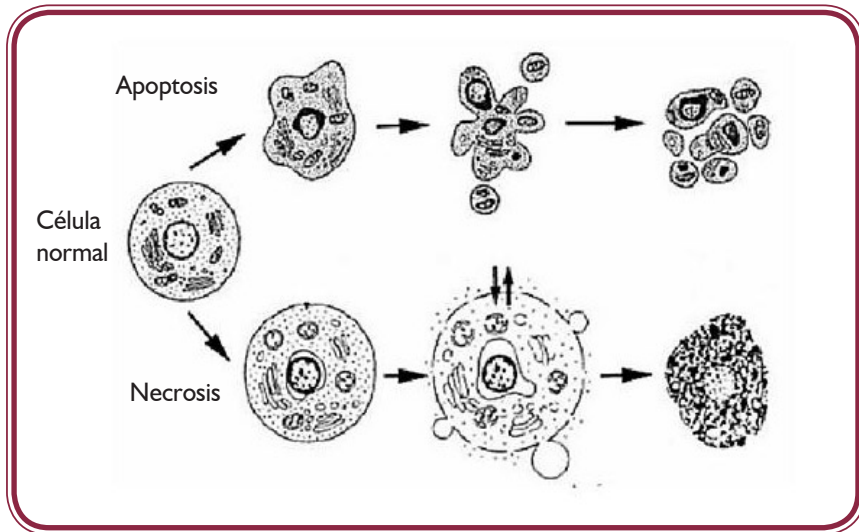


Figura 1. Representación esquemática de los cambios morfológicos en la muerte neuronal por necrosis y por apoptosis.

neuronas necróticas se observan eosinófilas, con morfología triangular y núcleos débilmente teñidos, pérdida del neuropilo e infiltrados inflamatorios. Al microscopio electrónico se puede observar la edematización de organelas con ruptura de membranas y fragmentación y distribución periférica de la cromatina nuclear hasta que en fases avanzadas se produce la disolución de todos los componentes celulares. El ADN de las células necróticas se destruye, por la acción de endonucleasas, de manera irregular en fragmentos que no siguen ningún patrón definido y que se visualizan como una mancha en la electroforesis (21,22,24).

La muerte por apoptosis se ha denominado muerte celular programada debido a que es un proceso activo que depende de la puesta en marcha de una cascada de eventos que se inician merced a señales específicas y de la expresión selectiva de determinados genes (21,22,24). Para que los mecanismos responsables de la muerte por apoptosis tengan lugar es necesario que exista una cierta reserva energética de tal manera que sea posible la expresión génica y la síntesis de las proteínas implicadas. Morfológicamente se caracteriza por la preservación de las membranas, de manera que en microscopía electrónica se pueden identificar adecuadamente las organelas, y por la fragmentación y condensación periférica de la cromatina nuclear. Si bien no se produce la lisis de membranas, la membrana plasmática se divide dando lugar a la fragmentación de la célula en numerosas vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos, que se pueden identificar en microscopía óptica (Figura 1). Puesto que no se produce la lisis de membrana ni la liberación del contenido celular, no se produce reacción inflamatoria, pero sí la fagocitosis posterior de los cuerpos apoptóticos por macrófagos u otras células. La condensación de la cromatina corresponde a un patrón típico de fragmentación del DNA por activación de una determinada enzima DNAsa en fragmentos internucleosomales de tamaño más o menos constante

(aproximadamente 180-200 pares de bases), lo que da lugar a un patrón en escalera en la electroforesis (21,22,24).

Como se mencionó, cada vez hay más evidencias de que ambos tipos de muerte celular están implicados en el daño cerebral producido por la isquemia y de que ambos procesos están íntimamente relacionados formando los dos extremos de un espectro continuo, ya que se ha podido demostrar que en una misma lesión algunas células mueren por necrosis, otras por apoptosis y otras por una combinación de ambas (25). Los marcadores de necrosis son más abundantes cuanto mayor es la intensidad y duración de la isquemia indicando que éste es el mecanismo fundamental de muerte cuando la depleción energética es mayor. Los estadios más precoces de la muerte celular por isquemia posiblemente impliquen una vía común para la necrosis y la apoptosis; cuando la disponibilidad energética es escasa predominan los mecanismos pasivos que constituyen la cascada isquémica conduciendo a la muerte por necrosis, mientras que si la isquemia es menos grave (menos intensa y duradera) y existe disponibilidad energética residual se pueden poner en marcha los fenómenos activos de la cascada de apoptosis y el balance se desvía hacia esta otra vía de muerte (26,27). De la misma manera cuando el tejido isquémico que sufre procesos de necrosis es tratado de manera incompleta se puede producir la muerte tardía por apoptosis y esto explicaría en parte por qué en muchos casos las distintas terapias de reperfusión o neuroprotección del tejido cerebral isquémico mediante inhibición de la cascada isquémica resultan ineficaces.

MUERTE CELULAR POR NECROSIS. LA CASCADA ISQUÉMICA

El déficit energético producido como consecuencia de la alteración del aporte de oxígeno y sustratos, ocasiona, en el core de infarto, donde la gravedad de la isquemia es máxima y la depleción energética casi total, la pérdida de la función de membrana y del gradiente iónico y la edematización y destrucción celular. En la zona de penumbra, donde existe flujo residual y el déficit de energía es menor, la isquemia ocasiona la pérdida de funciones celulares y esto da lugar a diversas alteraciones bioquímicas que tienen distintos efectos nocivos. Característicamente estas alteraciones se van encadenando, constituyendo la denominada cascada isquémica (28) (Figuras 2 y 3) y explican, en parte, la progresión de la lesión en el área de penumbra donde finalmente conducen a la destrucción de componentes celulares y a la muerte celular por necrosis (13-18,23,28).

En los primeros estadios de la isquemia, el déficit de oxígeno desvía el metabolismo de la glucosa por la vía anaerobia ocasionando el aumento de ácido láctico y acidosis. La acidosis inhibe la fosforilación oxidativa (29), contribuyendo a la depleción energética; favorece la edematización celular; aumenta la concentración de calcio libre intracelular al liberarlo de su unión a proteínas (30); contribuye a la lesión endotelial y a la alteración secundaria de la microcirculación y libera hierro iónico de su unión a proteínas en depósitos intracelulares lo que facilita la formación de radicales libres (hidroxilo) (31-34). Los radicales libres son muy tóxicos para componentes celulares y específicamente para la membrana causando su destrucción.

También desde etapas muy precoces, el fallo de membrana ocasionado por la depleción energética da lugar a la despolarización de las células afectadas. Esta despolarización se transmite en el área de penumbra de tal manera que parte de la energía residual va siendo consumida en la repolarización lo cual agrava el déficit energético. La despolarización ocasiona la entrada masiva

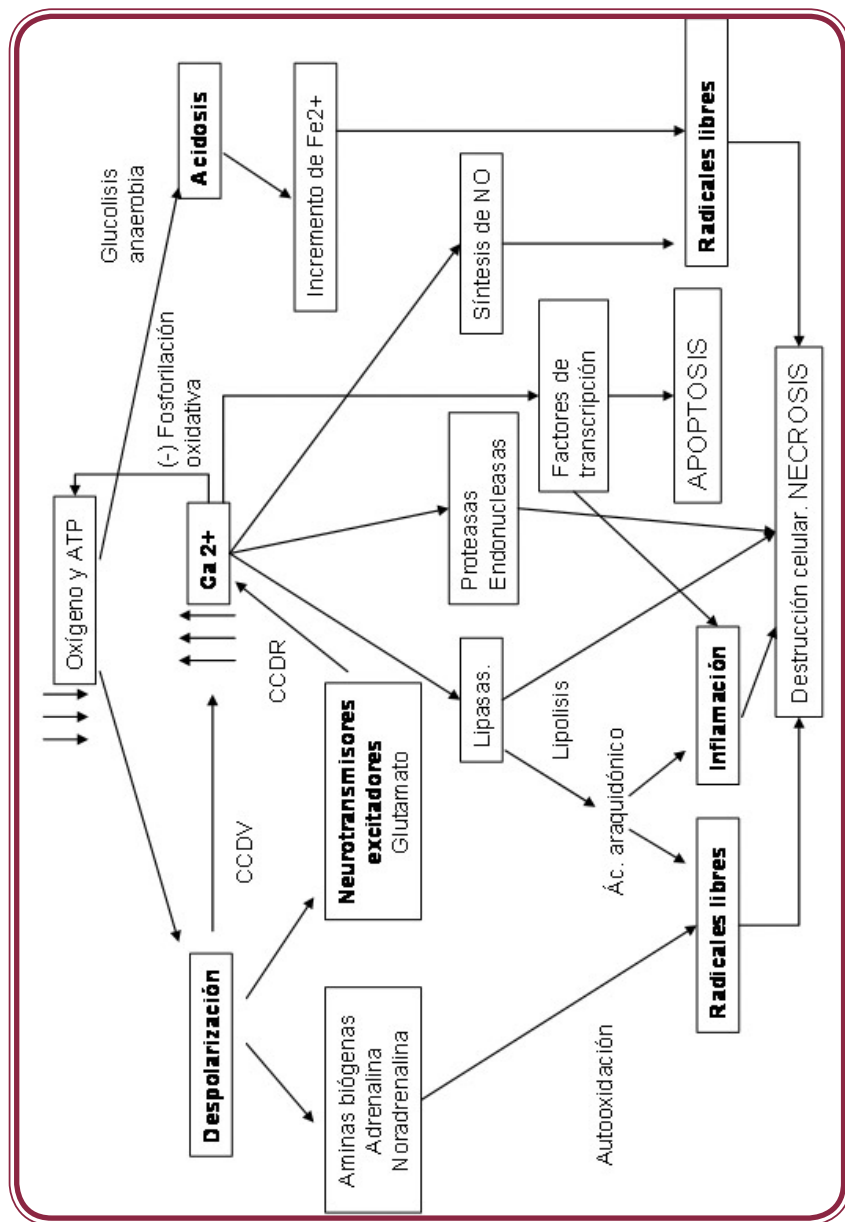


Figura 2. Esquema representativo de los mediadores bioquímicos implicados en la cascada isquémica y su interrelación. Modificado de Pulsinelli 1992 (28). En negrita se señalan los principales mediadores del daño isquémico, con el exceso citosólico de calcio ocupando un papel central.

CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje. **CCDR:** Canal de calcio dependiente de receptor. **NO:** Óxido nítrico.

de calcio al interior del citoplasma a través de canales dependientes de voltaje (35,36). Además la despolarización induce la liberación, desde terminales presinápticas, de aminoácidos excitadores como glutamato, que abren canales de calcio dependientes de receptor (AMPA y NMDA) en la neurona postsináptica y activan receptores metabotrofos (diacilglicerol, inositol-trifosfato, fosfocratina) que facilitan la liberación de calcio de depósitos intracelulares, incrementando la concentración de calcio libre intracelular (37). El calcio activa diversas enzimas líticas que destruyen componentes celulares (proteasas, lipasas, endonucleasas) (35), facilita la síntesis de óxido nítrico y la formación de radicales libres derivados de óxido nítrico (peroxinitritos) (38) y desacopla la fosforilación oxidativa comprometiendo aun más la disponibilidad energética (Figura 2).

Por otra parte el calcio activa diversos factores de transcripción que favorecen la activación de la cascada de apoptosis o bien la inhiben dependiendo de la concentración intracelular, constituyendo uno de los factores que relacionan ambas vías de muerte celular. Así, concentraciones normales de calcio favorecerían la expresión de genes de supervivencia, concentraciones moderadas la expresión de genes de muerte inductores de apoptosis y concentraciones masivas, por los mecanismos descritos inducirían necrosis (39-41). La isquemia induce también una respuesta inflamatoria que depende de la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa-beta (NFB) que da lugar a la expresión de citocinas proinflamatorias que, junto a la acción quimiotáctica de los leucotrienos producidos por la actividad de fosfolipasas activadas por calcio inducen la infiltración leucocitaria. Los propios leucocitos segregan posteriormente más citocinas y moléculas de adhesión para perpetuar el proceso. La respuesta inflamatoria juega un importante papel en la alteración del flujo en la microcirculación y en la destrucción tisular (42,43).

MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

La apoptosis es un fenómeno activo que depende de la puesta en marcha de una cadena de señales intracelulares iniciadas por la expresión de genes activados por la exposición a agentes nocivos, en este caso la isquemia, que conducen a la activación de enzimas con actividad proteolítica, denominadas caspasas. Se han descrito al menos 14 caspasas diferentes, algunas de las cuales se denominan “iniciadoras”, y tienen funciones de activación de la cadena, originando la fragmentación de la forma proenzimática inactiva de otras caspasas para su conversión en forma activa.

Las caspasas “efectoras”, principalmente la caspasa 3, destruyen proteínas citoplásmicas o nucleares necesarias para la supervivencia celular. Así mismo activan otras enzimas que destruyen componentes celulares o que contribuyen a activar la cascada de procesos promotores de apoptosis. La activación de las caspasas depende del equilibrio estrecho entre la expresión de señales de muerte (genes y proteínas proapoptóticas) y las señales de supervivencia (genes y proteínas antiapoptóticas) y puede iniciarse por estímulos nocivos externos o bien por estímulos intracelulares como el daño del DNA (44,45).

Los diversos estímulos nocivos se traducen en señales de muerte mediante la activación de factores de transcripción que dan lugar a la expresión selectiva de determinados genes y a la síntesis de proteínas traductoras de la señal. Estas activan la cascada de la apoptosis a través de dos

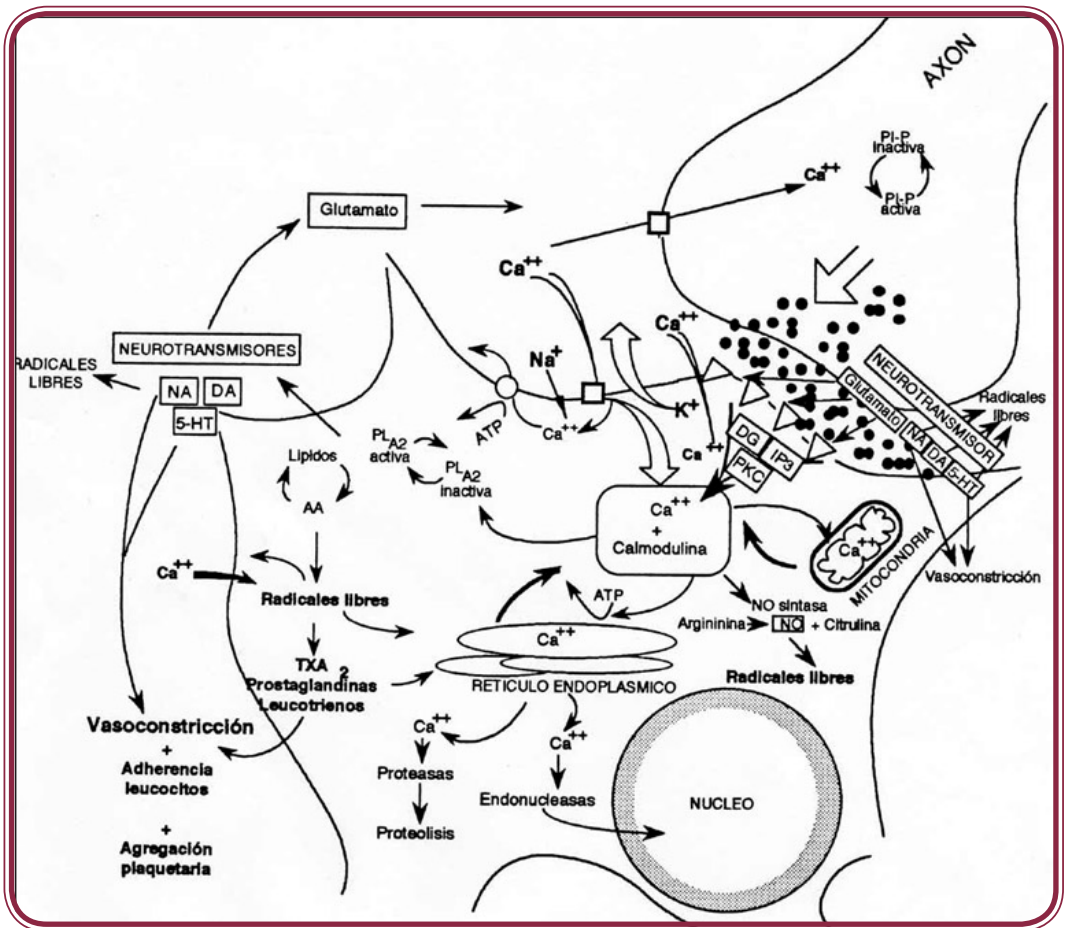


Figura 3. Mecanismos celulares de daño por isquemia. Modificado de Díez-Tejedor E, Alonso de Leciñana M, 1998 (23).

vías fundamentales: la vía extrínseca o dependiente de receptor y la vía intrínseca o mitocondrial independiente de receptor (Figura 4). Se ha descrito recientemente una vía alterna para la activación de caspasas que dependería de la acción de calpaina, una enzima proteolítica activada por calcio y responsable de proteólisis en la muerte por necrosis. Este supondría otro mecanismo de interrelación entre mediadores de necrosis y apoptosis (46).

Existe además una vía de activación de apoptosis independiente de caspasas que implica la liberación mitocondrial de factor inductor de apoptosis (AIF). El daño del DNA de cualquier etiología induce la activación de la enzima reparadora poli-ADP-ribosa polimerasa-I (PARPP-I). La activación masiva de PARPP-I consume los depósitos de NAD mitocondrial y ello induce la liberación de AIF que produce la fragmentación del DNA (47,48) (Figura 4). Esta es otra posible vía

de relación entre los mecanismos responsables de la muerte celular por necrosis y por apoptosis si tenemos en cuenta que el DNA se lesiona tras la activación de la cascada isquémica de necrosis por efecto de los radicales libres o de endonucleasas activadas por calcio.

VÍA INTRÍNSECA DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS

La mitocondria juega un importante papel en la regulación de los mecanismos de muerte neuronal (49). En la membrana mitocondrial se expresan diversas proteínas de la familia Bcl-2 que tienen, entre otras, funciones de regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Algunas de estas proteínas tienen efecto antiapoptótico (Bcl-2, Bcl-xl) y otras proapoptótico (Bax, Bad, Bid, Bcl-xs) (50). Del equilibrio entre la expresión de los componentes anti y proapoptóticos y de su localización en la membrana mitocondrial, depende la permeabilidad de la mitocondria a los factores implicados en la apoptosis. En condiciones normales Bcl-2 y otras proteínas inhibitoras de apoptosis (IAP) se expresan en la membrana mitocondrial y después de la isquemia se sobreexpresan como mecanismo de protección y reducen la permeabilidad mitocondrial (51). Pero si la isquemia es suficientemente importante, se produce la sobreexpresión selectiva de genes como *c-jun* que favorecen la síntesis de proteínas que liberan Bad de sus secuestradores citoplásmicos y activan otras proteínas proapoptóticas como Bid. Esto permite su translocación a la mitocondria para aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, de modo que se liberan al citoplasma citocromo C (Cit C) y factor activador de proteasas de apoptosis -I (Apaf-I) (46,47,52,53). Cit C y Apaf-I se unen a la procaspasa 9 formando un complejo denominado apoptosoma que permite la activación de caspasa 9 y la transformación de procaspasa 3 en la forma activa de caspasa 3 (46,47,49). Además se libera el complejo Smac-DIABLO que se une a las IAPs neutralizando su efecto antiapoptótico, puesto que sólo en presencia de Smac/DIABLO se libera caspasa 3 de la unión a IAPs para ejecutar la muerte por apoptosis (47).

VÍA EXTRÍNSECA DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS

Existen receptores de superficie celular pertenecientes a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (FNT) como FAS. Estos receptores contienen una determinada secuencia de aminoácidos denominada “dominio de muerte”, por la cual se unen a moléculas adaptadoras como FADD (Proteína asociadora de FAS con dominio de muerte). Estas a su vez contienen otro dominio llamado efector de muerte por el que se unen a procaspasa 8. Cuando FAS se activa por la unión de su ligando (FASL) forma un complejo con FADD y procaspasa 8, para la activación de esta a caspasa 8. Esta permite la activación de caspasa 3, pero también de Bid, lo que induce la activación secundaria de la vía mitocondrial de apoptosis (Figura 4) (45,54).

MECANISMOS DE MUERTE CELULAR TRAS ISQUEMIA FOCAL

En la fisiopatología de la destrucción celular tras isquemia focal juegan papel fundamental los mecanismos de necrosis, mediados fundamentalmente por fenómenos de excitotoxicidad que desencadenan el incremento citoplásmico de calcio a través de los distintos tipos de canales, la activación de enzimas líticas, el exceso de óxido nítrico, así como la respuesta

inflamatoria y el exceso de radicales libres que tendrían su papel fundamental durante la reperfusión (13,14,23).

Sin embargo cada vez se atribuye mayor papel a los mecanismos de apoptosis, una vez demostrados los fenómenos de muerte tardía a pesar del restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral regional (14,16-20). Además, esta vía de muerte celular puede ser predominante en el área de penumbra isquémica, en la que existe energía residual, cuando los tratamientos, bien sea la reperfusión o la inhibición de los mediadores de la cascada isquémica mediante neuroprotectores no son suficientes para eliminar por completo las alteraciones bioquímicas producidas en las células afectadas ni para bloquear sus efectos nocivos a largo plazo. Ya se ha explicado que existen mediadores comunes de activación de la necrosis y la apoptosis dependiendo de la energía residual, fundamentalmente dependientes de los niveles intracitoplásmicos de calcio y de la actividad de las mitocondrias.

En el caso de la isquemia focal adquieren gran importancia factores que pueden modular, junto con la duración de la isquemia, la capacidad de resistencia del tejido en penumbra, como son la existencia y eficacia de circulación colateral y la presión arterial, ya que en el área de penumbra en que fracasan los mecanismos de regulación de la circulación cerebral, el flujo sanguíneo regional se hace directamente dependiente de la presión de perfusión (55,56), los niveles de glucemia (56,57) y la temperatura (58,59). Se mencionan sólo algunos datos que indican que la muerte por apoptosis se inicia desde etapas muy precoces ya en el core de infarto, así como algunas particularidades de este tipo de muerte celular en esta forma de isquemia cerebral.

En el core de infarto se detecta activación de caspasa 3 muy precozmente, después de 1 hora del insulto isquémico. Posteriormente, a las 3 horas, sus niveles decaen y comienzan a detectarse otra vez en el área de penumbra después de 12 horas de isquemia. La elevación de caspasa 3 en el core de infarto ocurre simultáneamente con el incremento de caspasa 8 lo que indica una activación muy temprana de la vía de apoptosis dependiente de receptor (20,60). Esto coincide con hallazgos de nuestro laboratorio que demuestran, en un modelo de isquemia cerebral focal por ligadura de arteria cerebral media, un aumento de expresión de mRNA de ligando de FAS desde las primeras horas de la isquemia (61). Más tardíamente en el área de penumbra se vuelve a producir un incremento de caspasa 3 que, en este caso, se asocia a elevación de caspasa 9, lo que indicaría activación predominante de la vía mitocondrial de la apoptosis (60). Sin embargo estos datos no han sido corroborados en otros estudio en los que no se demuestra activación de caspasa 3 tras isquemia cerebral focal permanente y en los que se ha comprobado que la necrosis prevalece en el core de infarto debido al fallo energético con importante activación de calpaina (observación personal pendiente de publicación).

Parece por lo tanto que en el área de penumbra, la apoptosis sería, efectivamente, un fenómeno más tardío, secundario a la disregulación mitocondrial a favor de las señales de muerte en condiciones en que los cambios bioquímicos desencadenados por la isquemia persisten, aunque con menor intensidad que en el core de infarto, produciendo, merced a la existencia de energía residual, la activación y expresión de genes promotores de muerte celular.

En conclusión, la isquemia cerebral focal es un proceso complejo y dinámico en el que se desencadenan un conjunto de señales bioquímicas y genéticas que conducen a la destrucción de componentes celulares y a la muerte celular por mecanismos de necrosis y apoptosis. Ambos

tipos de muerte parecen estar relacionados, de manera que serían los dos extremos de un espectro continuo que se decantaría hacia uno u otro lado en función de la intensidad y duración de la isquemia, así como de la gravedad de la depleción energética producida y de la existencia o no de energía residual. Conocer los mecanismos responsables de la muerte celular tras la isquemia, sus factores agravantes y su perfil temporal de expresión permitirá aplicar medidas terapéuticas neuroprotectoras eficaces dirigidas a inhibir los mediadores de lesión para reducir las consecuencias de esta devastadora enfermedad.

REFERENCIAS

- [1] **Martínez Vila E, Irimia P.** Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20 (suppl 2): 148-158.
- [2] **Díez Tejedor E Fuentes B.** Homeostasis as basis of acute stroke treatment: Stroke Units are the key. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20 (suppl 2): 129-134.
- [3] **Alonso de Leciñana M, Díez Tejedor E, Gutierrez M, Guerrero S, Carceller F, Roda JM.** New goals in ischemic stroke therapy: The experimental approach. Harmonizing science with practice. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20 (suppl 2): 159-168.
- [4] Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. *Stroke* 1990; 21: 637-676.
- [5] **Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F.** The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 1988; 19:1083-1092.
- [6] **Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabin J.** En nombre del Comité ad hoc del GEECV de la SEN. Ictus. Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurología* 2002; 17 (suppl 3): 3-12.
- [7] **Leira R, Blanco M, Rodríguez-Yañez M, Flores J, García-García J.** Non-pharmacological neuroprotection: role of emergency stroke management. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21 (suppl 2): 89-98.
- [8] **Fisher M.** The ischemic penumbra: identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17 (suppl 1): 1-6.
- [9] **Hossmann KA.** Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36: 557-565.
- [10] **Baron JC.** Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* 2001; 11 Suppl 1: 2-8.
- [11] **Ginsberg MD, Pulsinelli WA.** The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 1994; 36: 553-554.
- [12] **Astrup J, Siesjö BK, Symon L.** Thresholds in cerebral ischemia. The ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12: 723-727.
- [13] **Siesjö BK.** Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77: 169-184.
- [14] **Siesjö BK.** Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 1992; 77: 337-354.
- [15] **Ginsberg MD.** Injury mechanisms in the ischemic penumbra. Approaches to neuroprotection in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1997; 7 (suppl 2): 7-12.
- [16] **García JH.** The evolution of brain infarcts. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51:387-393.
- [17] **García JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ.** Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; 26: 627-635.
- [18] **García, JH; Liu, KF; Ho, KL.** Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 1995; 26: 636-643.
- [19] **Kuroda S, Siesjo BK.** Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci* 1997; 4:199-212
- [20] **Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ.** Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke

- in the rat. *J Neurosci* 1999; 19: 5932-5941.
- [21] **Choi DW**. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 667-672.
- [22] **Majno G, Joris I**. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- [23] **Díez-Tejedor E, Alonso de Leciñana M**. Fisiopatología de la isquemia cerebral. El daño de isquemia-reperusión. En Barinagarrementeria F, Cantú C Eds. Enfermedad vascular cerebral. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, 1998: 13-27.
- [24] **Jiménez del Río M, Vélez-Pardo C**. La apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas: evidencias y controversias. *Rev Neurol* 2001; 32: 851-860.
- [25] **Graham SH, Chen J**. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 99-109.
- [26] **Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G**. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997; 15: 1573-1581.
- [27] **Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C**. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998; 46: 281-309.
- [28] **Pulsinelli W**. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 1992; 339: 533-536.
- [29] **Hillered L, Smith ML, Siesjö BK**. Lactic acidosis in recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985; 5: 259-266.
- [30] **Folbergrova J, Minamisawa H, Ekholm A**. Phosphorylase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K⁺ and Ca²⁺. *J Neurochem* 1990; 55: 1690-1696.
- [31] **Lipscomb DC, Gorman LG, Traystman RJ, Hurn PD**. Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke* 1998; 29: 487-493.
- [32] **Hurn PD, Koehler RC, Blizzard KK, Traystman RJ**. Desferoxamine reduces early metabolic failure associated with severe cerebral ischemic acidosis in dogs. *Stroke*, 1995, 26: 688-695.
- [33] Dávalos A, castillo J, marrugat J, Fernández-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 2000; 54: 1568-1574.
- [34] **Lipscomb DC, Gorman LG, Traystman RJ, Hurn PD**. Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke* 1998; 29: 487-493.
- [35] **Siesjö BK**. Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur J Neurol* 1990, 30 (suppl 2): 3-9.
- [36] **Ohta K, Graf R, Rosner G, Heiss WD**. Calcium ion transients in peri-infarct depolarizations may deteriorate ion homeostasis and expand infarction in focal cerebral ischemia in cats. *Stroke* 2001; 32: 535-543.
- [37] **Choi DW**. Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988; 11: 465-469.
- [38] **Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Sarribas O, dalkara T**. Role of endotelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperusión injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000; 31: 1974-1980.
- [39] **Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H**. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 2002; 5: 405-414.
- [40] **Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD**. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 2002; 34: 371-385.
- [41] **Hardingham GE, Bading H**. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 2003; 26: 81-89.
- [42] **Barone FC, Feuerstein GZ**. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819-834.
- [43] **del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ**. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 2000; 10: 95-112.
- [44] **Hengartner MO**. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
- [45] **Yuan J, Yankner BA**. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407: 802-809.
- [46] **Krajewska M, Rosenthal RE, Mikolajczyk J, Stennicke HR, Wiesenthal T, Mai J, Naito M, Salvesen GS,**

- Reed JC, Fiskum G, Krajewski S.** Early processing of Bid and caspase-6, -8, -10, -14 in the canine brain during cardiac arrest and resuscitation. *Exp Neurol* 2004; 189: 261-279.
- [47] **Wang X.** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933.
- [48] **Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL.** Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297:259-263.
- [49] **Kroemer G, Reed JC.** Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513-519.
- [50] **Reed JC.** Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 387: 773-776.
- [51] **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-1132.
- [52] **Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC.** Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999; 284: 339-343.
- [53] **Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
- [54] **Yuan J.** Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 247-251.
- [55] **Boisvert DP, Gelb AW, Tang C, Lam AM, Mielke B, Dowman R.** Brain tolerance to middle cerebral artery occlusion during hypotension in primates. *Surg Neurol* 1989; 31: 6-13.
- [56] **Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS.** Effect of blood pressure and diabetes on stroke progression. *Lancet* 1994; 344: 156-159.
- [57] **Li P-A, Siesjö BK.** Role of hyperglycaemia-related acidosis in ischaemic brain damage. *Acta Physiol Scand* 1997; 161: 567-580
- [58] **Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY-T, Dietrich WD, Busto R.** Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 4: 189-225.
- [59] **Kim Y, Busto R, Dietrich WD, Kraydieh S, Ginsberg MD.** Delayed postischemic hyperthermia in awake rats worsens the histopathological outcome of transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27: 2274-2281.
- [60] **Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B.** Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001; 21: 7127-7134.
- [61] **Alonso de Leciñana M, Gutiérrez M, Ceña V, Santos P, García S, Sobrado M, Díez Tejedor E.** Expresión génica de apoptosis e inflamación en isquemia cerebral focal. Estudio experimental en rata. *Neurología* 2003; 18: 490.