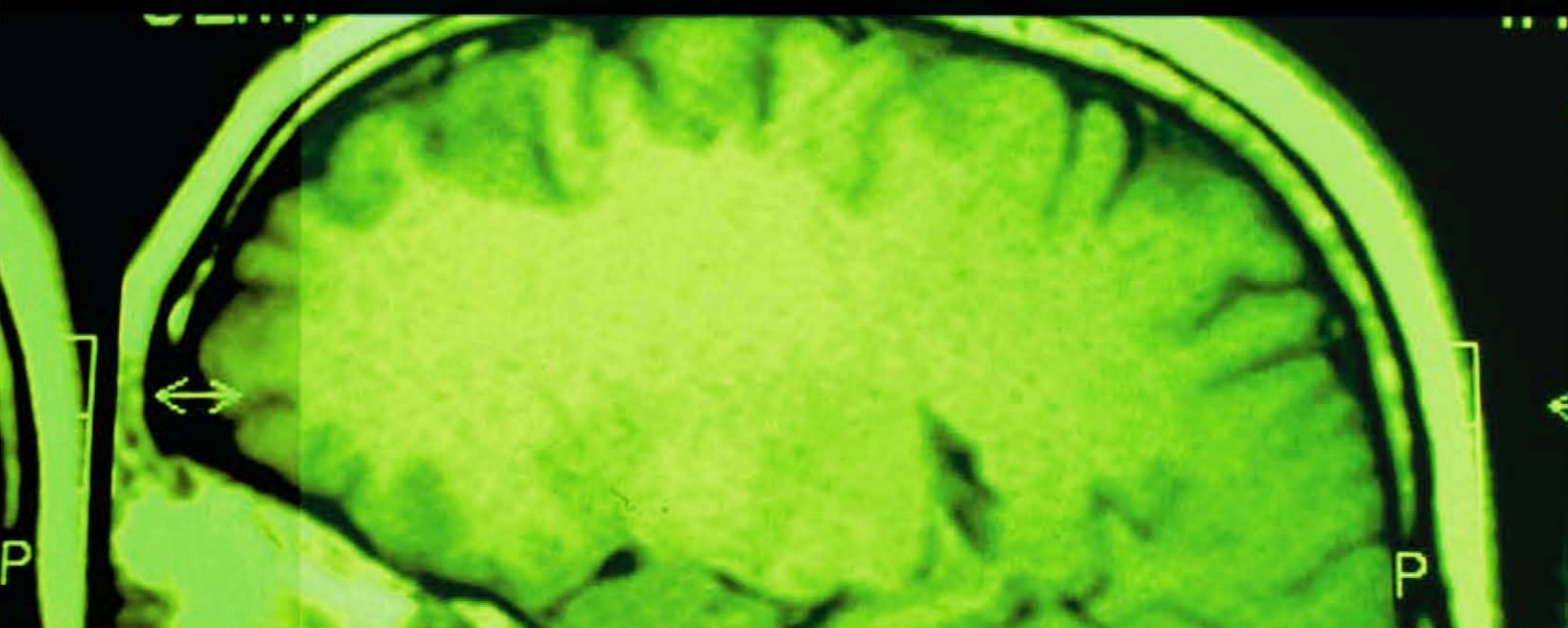


Alteracions del senyal de la MRI en la isquèmia transitòria i la seva correlació histopatològica



• Escrit per
 • **Santiago Rojas**
 • Premi Gemma Rosell i Romero

La utilització de la imatge per ressonància magnètica (MRI) permet estudiar la mort neuronal retardada induïda per la isquèmia cerebral transitòria en la rata. Amb aquest rosegador es pot modelar l'íctus isquèmic mitjançant una tècnica quirúrgica d'abordatge endovascular de la circulació cerebral. Aquests estudis permeten reflexionar sobre la relació entre les alteracions histopatològiques i les alteracions en la MRI, així com sobre el valor predictiu d'aquesta per detectar una lesió tissular secundària en la isquèmia.

Introducció

L'íctus isquèmic és el quadre clínic que es produeix com a conseqüència de l'obstrucció d'una artèria encefàlica que condueix a la necrosi del teixit que aquesta irrigava. Es tracta d'una patologia extremadament freqüent, amb un cost socio-sanitari enorme i que arriba a ser la segona causa de mort entre les dones i la tercera entre els homes, a més d'una de les principals causes de discapacitat en majors de 60 anys.

En els darrers anys la imatge per ressonància magnètica (MRI) s'ha convertit en una eina essencial per a l'estudi d'aquesta patologia per dos motius. En primer lloc, detecta amb una sensibilitat òptima i en temps molt inicials (menys de 3 hores) la presència d'isquèmia tissular en el teixit encefàlic. En segon lloc, és una tècnica molt versàtil que permet en una sola exploració obtenir diferents tipus d'imatges que ens informen de paràmetres com la mobilitat de les molècules d'aigua en el teixit, la seva abundància relativa, la presència d'obstruccions a les artèries leptomeníngees, els nivells de perfusió tissular o la integritat de la barrera hematoencefàlica, només per citar-ne alguns. Si a tot això hi afegim que té una sensibilitat per detectar les hemorràgies intraparenquimàtiques similar al TAC, entendrem perquè alguns autors la consideren la prova d'elecció per a l'estudi de l'íctus isquèmic.

La possibilitat de realitzar estudis amb aquesta tècnica en animals d'experimentació ens donava l'ocasió de treballar sobre dues qüestions que despertaven el nostre interès. Per una banda, en certs models animals d'íctus en què es produeix

una interrupció transitòria del flux sanguini, sabem que es desencadena un procés de mort retardada que es desenvolupa en les 12-24 hores següents al restabliment del flux. La pregunta era, doncs, si la MRI podia ser útil per estudiar aquest procés, en especial si seria capaç d'identificar el teixit que desenvoluparia aquest tipus de lesió. Per altra banda, estàvem interessats en estudiar quines eren les alteracions histopatològiques que justificaven les alteracions en la MRI, perquè malgrat que els estudis realitzats, en especial en humans, són extensos, els seus correlats histopatològics són encara escassos.

Abordatge experimental i resultats

Per intentar abordar aquestes qüestions es va realitzar un model d'íctus en rata. Aquest model consisteix en induir una isquèmia transitòria del territori de l'artèria cerebral mitjana d'una hora de durada. Aquesta alteració transitòria del flux acaba provocant l'aparició d'un infart del territori d'aquesta artèria. Per aconseguir aquesta interrupció transitòria de l'aportació sanguínia, s'aborda l'artèria cerebral mitjana per via endovascular amb un filament de niló a través del territori carotídi. Un cop transcorregut el temps d'isquèmia desitjat es pot retirar el filament i permetre la reperfusió del territori cerebral afectat. Es va practicar la tècnica d'oclusió endovascular de l'artèria cerebral mitjana a 54 rates mascles de 280-320 g de pes i es van estudiar per MRI a diferents temps, després de la reperfusió i també durant l'oclusió. Alguns animals del grup experimental es van estudiar dues vegades durant l'experiment, cosa que va permetre obtenir millors dades de l'evolució de les alteracions en la MRI al

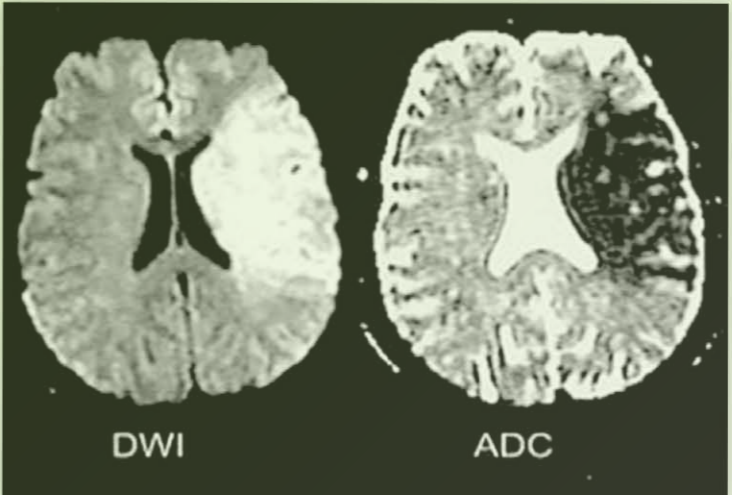


Figura 1. MRI d'un pacient amb íctus isquèmic de l'artèria cerebral mitjana. S'observen les característiques alteracions en les seqüències de DWI i ADC. Aquestes alteracions corresponen a una disminució de la difusibilitat de les molècules d'aigua en aquests territoris.

Figura 2. B i E: progressió de les alteracions en la MRI durant la reperfusió; imatges ponderades en difusió (DWI). C i F: imatges ponderades pel coeficient aparent de difusió de l'aigua (ADC). S'observa un creixement progressiu de l'alteració durant les 24 hores de reperfusió coincident amb la instauració de l'infart cerebral. Aquesta lesió es fa patent abans a l'estriat que al còrtex.

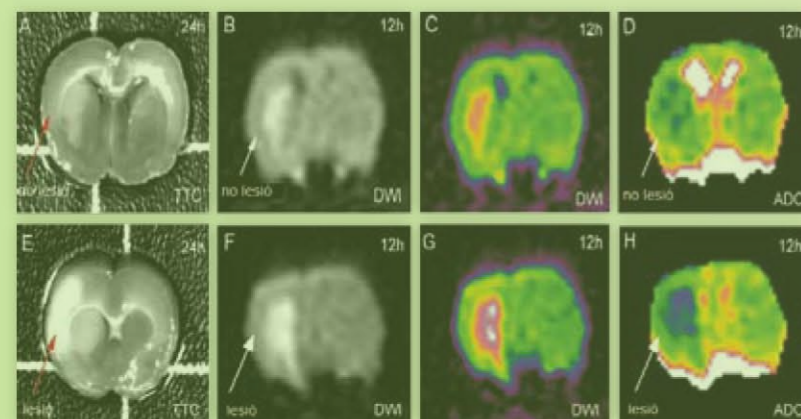
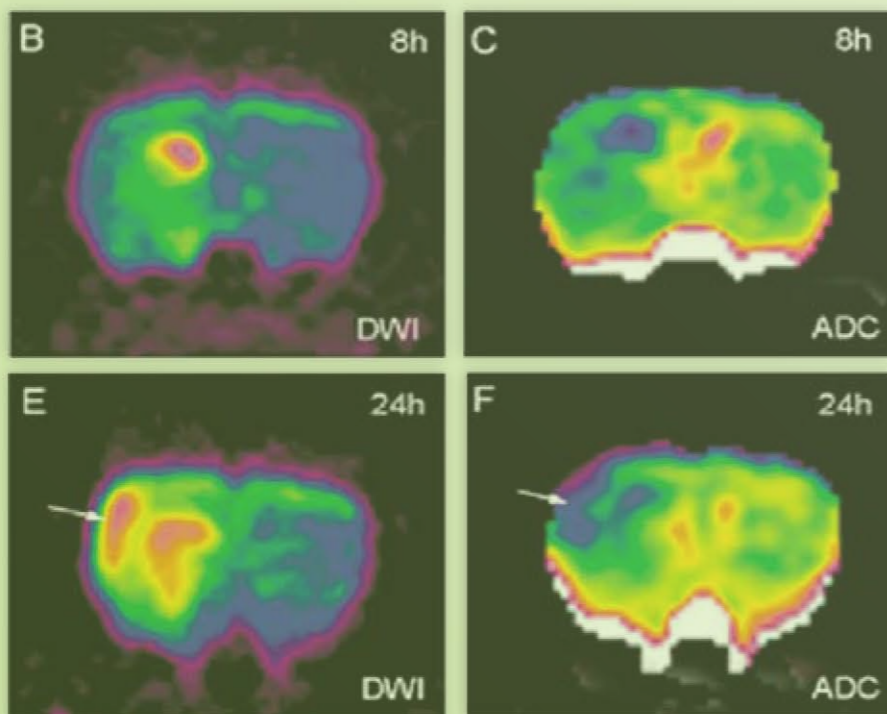


Figura 3. Petites alteracions en la MRI cortical a les 12 hores predeuen l'aparició d'infart. A-D: animal que no ha desenvolupat infart cortical a les 24 hores; observem que a les 12 hores no hi ha alteració ni a la DWI ni a l'ADC. E-H: animal que ha desenvolupat infart a les 24 hores; a la seva MRI de les 12 hores s'aprecien canvis en l'àmbit cortical a la DWI i a l'ADC. Cal destacar quant discrets són aquests canvis, en especial si es comparen amb el grau d'alteració que presenta l'estriat. Les imatges A-E corresponen a la tècnica del clorur de trifènil de tetrazole que posa de manifest l'infart cerebral com a zones pàl·lides.

llarg del temps i sobretot de quins eren els canvis lligats a la reperfusió. Un cop realitzat l'estudi amb MRI, es van sacrificar els animals i es va sotmetre el teixit cerebral a una tinció amb clorur de trifènil de tetrazole que tenyeix de vermell el teixit viable i deixa sense tenyir el teixit infartat. Aquesta tècnica ens va permetre determinar, per cada temps, quin era el teixit que ja havia desenvolupat la lesió. Aquests mateixos cervells es van

estudiar posteriorment amb tècniques d'histopatologia clàssica i amb immunohistoquímica.

Els estudis que es van portar a terme de MRI es van centrar sobretot en les imatges ponderades en difusió (DWI) i en les ponderades pel coeficient aparent de difusió de l'aigua (ADC). Aquests tipus d'estudis ens informen del grau de difusibilitat de les molècules d'aigua en el teixit. De fet, ambdues reflecteixen el mateix fenomen: durant la isquèmia cerebral hi ha una caiguda de la producció d'ATP que condueix al fracàs de les bombes iòniques que mantenen el gradient osmòtic. Es produeix una entrada d'aigua massiva a l'interior de la cèl·lula donant lloc al que es coneix com a edema citotòxic. Com que l'espai intracel·lular és més restringit que l'extracel·lular, la difusibilitat d'aquestes molècules és menor i això és el que genera les alteracions que s'observen en les imatges de MRI (ADC i DWI).

Es va poder observar que durant la isquèmia hi havia una gran alteració en l'ADC i la DWI, aquesta alteració es reverteix amb la reperfusió per tornar a aparèixer després de forma progressiva però inexorable. Així doncs, a les 8 hores de la reperfusió s'observava una disminució de l'ADC en l'estriat. L'estudi posterior en els mateixos animals posava de manifest que a les 24 hores l'alteració de l'ADC ja s'havia estès també a l'àmbit cortical. Determinàvem, doncs, que els canvis en la MRI apareixien de forma més progressiva en el còrtex cerebral. Això indica que l'aparició de

l'infart en aquest tipus de model es dona per un procés de mort retardada i aquesta té un paper més destacat en el còrtex. L'estudi *postmortem* de l'encèfal amb la tinció de clorur de trifènil de tetrazole va demostrar que l'aparició de l'infart coincidia amb l'aparició de les alteracions en la MRI. Així doncs, a les 8 hores, l'infart era només evident en l'àmbit estriatal, mentre que a les 24 hores ja afectava també al còrtex cerebral.

Per altra banda, es va poder treure profit del que *a priori* es considera un inconvenient del model i que consisteix en el fet que alguns dels animals no tenen una caiguda del flux cerebral suficient com per lesionar el còrtex cerebral. En general tots presenten lesions en l'estriat, ja que la irrigació d'aquest té poques aportacions col·laterals. En canvi, la irrigació cortical presenta gran nombre d'anastomosis subleptomeningies que permeten una aportació col·lateral des de la part cerebral anterior i posterior, si s'ocloca l'artèria cerebral mitjana a la zona proximal. Aquestes anastomo-

sis presenten diferències interindividuais, que són les responsables que alguns animals no desenvolupin lesió cortical.

En qualsevol cas, el fet que alguns d'aquests animals no presentessin lesió en aquest àmbit a les 24 hores de la isquèmia, mentre que d'altres sí ho feien, ens va permetre determinar quines eren les alteracions prèvies en la MRI que podien prevenir quin teixit acabaria per desenvolupar infart. És a dir, estàvem en condicions de determinar si hi havia canvis en les imatges de MRI que delatessin que s'estava produint un procés de mort cel·lular retardada en el parènquima cerebral. En efecte, es va observar que a les 12 hores de la reperfusió, els animals que havien desenvolupat infart cortical a les 24 hores presentaven una lleugera alteració en l'ADC i la DWI. Aquesta alteració era molt discreta, tan sols del 5% del valor contralateral –de fet difícilment apreciable si no s'analitza la imatge a consciència–, però ens permetia determinar quin era el teixit que patiria l'evolució cap a infart ce-

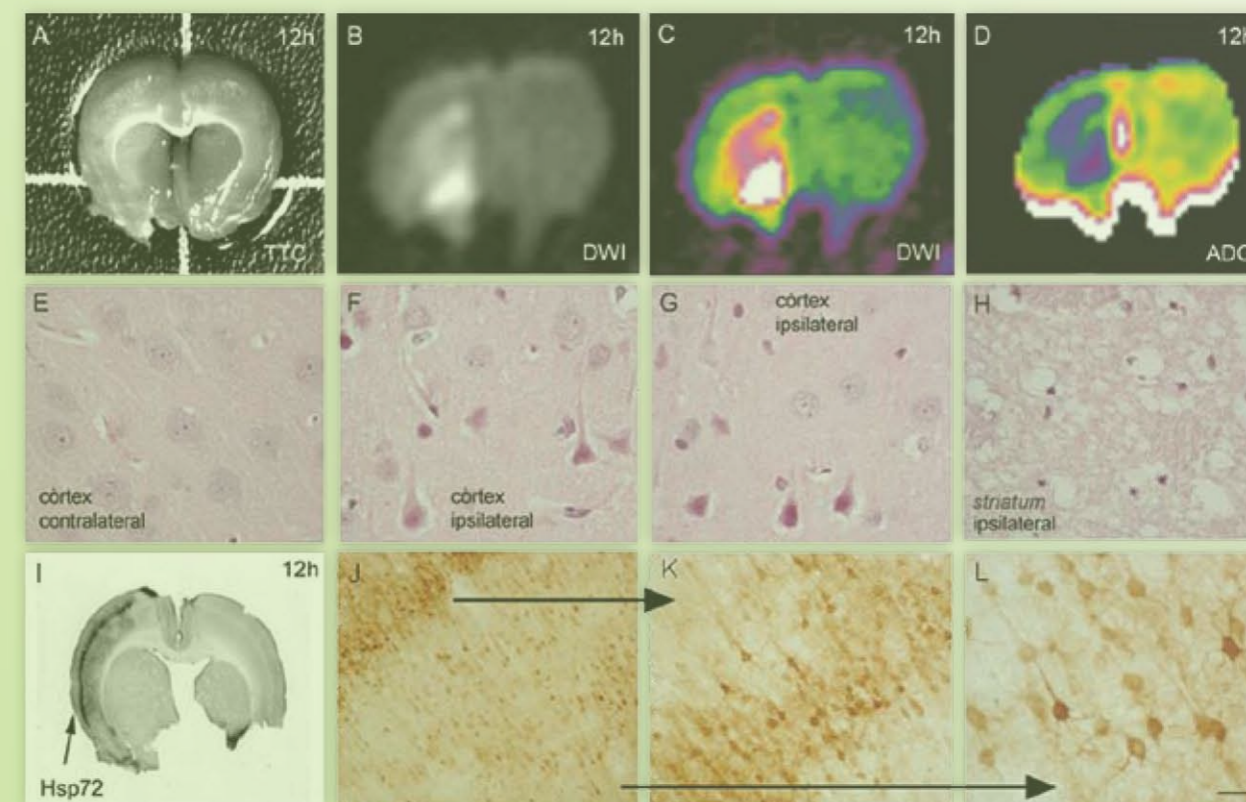


Figura 4. Correlació histopatològica amb les corresponents alteracions en la MRI a les 12 hores. Es pot observar una lleugera alteració cortical en la MRI que es correspon amb una mort neuronal heterogènia i amb l'expressió de la proteïna d'estrès HSP72 en aquestes neurones. En l'àmbit estriatal l'alteració en la MRI és més important i la lesió histològica complerta. F-G: histologia del còrtex a les 12 hores; s'observen neurones acidòfiles junt amb neurones de morfologia normal. H: histologia de l'estriat afectat; s'observa la panecrosi amb intensa vacuolització del neuròpil. I-L: expressió d'HSP72; cèl·lules de fenotip neural s'observen com a positives. El marcatge és especialment intens en la capa de cèl·lules piramidals.

rebral. Els animals que no desenvolupaven infart cortical a les 24 hores no tenien cap mena de disminució dels valors d'ADC a les 12 hores.

L'estudi histològic d'aquestes regions corticals amb alteracions moderades de l'ADC a les 12 h de reperfusió va posar de manifest que hi havia una afectació cel·lular heterogènia. Era possible trobar neurones amb una marcada acidofília i condensació nuclear juntament amb signes d'edema cel·lular, mentre que les neurones veïnes podien tenir un aspecte absolutament normal. S'observava que la tinció amb clorur de trifenil de tetrazole no posava de manifest com a infartades aquestes regions. Per altra banda, les zones que apareixien com a infartades amb el clorur de trifenil de tetrazole (còrtex a les 24 hores, estriat a les 8-12 hores) presentaven una panecrosi amb vesiculació abundant del neuròpil.

La immunohistoquímica per l'HSP72, una proteïna de xoc tèrmic que s'expressa en diferents situacions d'estress cel·lular, era molt positiva en l'àmbit de les regions corticals que presentaven alteració de l'ADC a les 12 hores. Aquest marcatge corresponia sobretot a neurones que presentaven una morfologia normal. Els animals amb infart

cortical sacrificats a les 24 hores presentaven un marcatge per l'HSP72 limitat a les regions limítrofes de l'infart i es marcaven com a positius d'altres tipus cel·lulars no neuronals.

L'estudi immunohistoquímic de la proteïna glial àcida fibril·lar (GFAP) i de l'antigen (OX42) ens van permetre estudiar la reacció astrocitària i microglial, respectivament. Així doncs, es va observar que hi havia alteracions gials consistents en una progressiva vacuolització dels astròcits en la MRI. A les 24 hores, es va observar que els astròcits havien desaparegut a les zones d'infart, amb la qual cosa el marcatge per la GFAP en aquestes regions i aquests temps resultava negatiu. S'establia, però, un fort marcatge en les zones marginals de l'infart que consistia en el procés de formació de la cicatriu glial.

Per la seva banda, la microglia experimentava un progressiu escurçament dels seus processos en les zones que estaven patint el procés de mort retardada. Aquests canvis consistien en el procés d'activació microglial que porta a aquestes cèl·lules del sistema fagocític mononuclear a convertir-se en macròfags actius dins les zones d'infart. I

Conclusions de l'estudi

- A la isquèmia transitòria de la rata es produeix un procés de mort cel·lular retardada que es pot donar al llarg de com a mínim 24 h.
- Aquest procés és més lent en l'àmbit cortical que en l'estriat.
- Els estudis de MRI (DWI i ADC) permeten estimar la mort cel·lular retardada.

- Els canvis en la MRI que preveuen la mort cel·lular retardada es relacionen amb una lesió neuronal heterogènia.
- La progressió de l'alteració en la MRI també es relaciona amb l'aparició de vacuolització astrocitària i amb l'activació microglial.

Aquest treball ha estat realitzat a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona en col·laboració amb l'Hospital Clínic, sota la direcció de la Dra. Anna Planas Obradors, i ha estat publicat a *Stroke* (2006), 37(6): 1525-32. Abraham Martín Muñoz és coautor del treball.

Referències

Meng, X. [et al.] (2004). Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia. *Ann. Neurol.*, 55(2): 207-12.

Neumann-Haefelin, T. [et al.] (2000). Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. *Stroke*, 31(8): 1965-72.

Rojas, S. [et al.] (2006). Modest MRI signal intensity changes precede delayed cortical necrosis after transient focal ischemia in the rat. *Stroke*, 37(6): 1525-32.

Rordorf, G. [et al.] (1998). Regional ischemia and ischemic injury in patients with acute middle cerebral artery stroke as defined by early diffusion-weighted and perfusion-weighted MRI. *Stroke*, 29(5): 939-43.

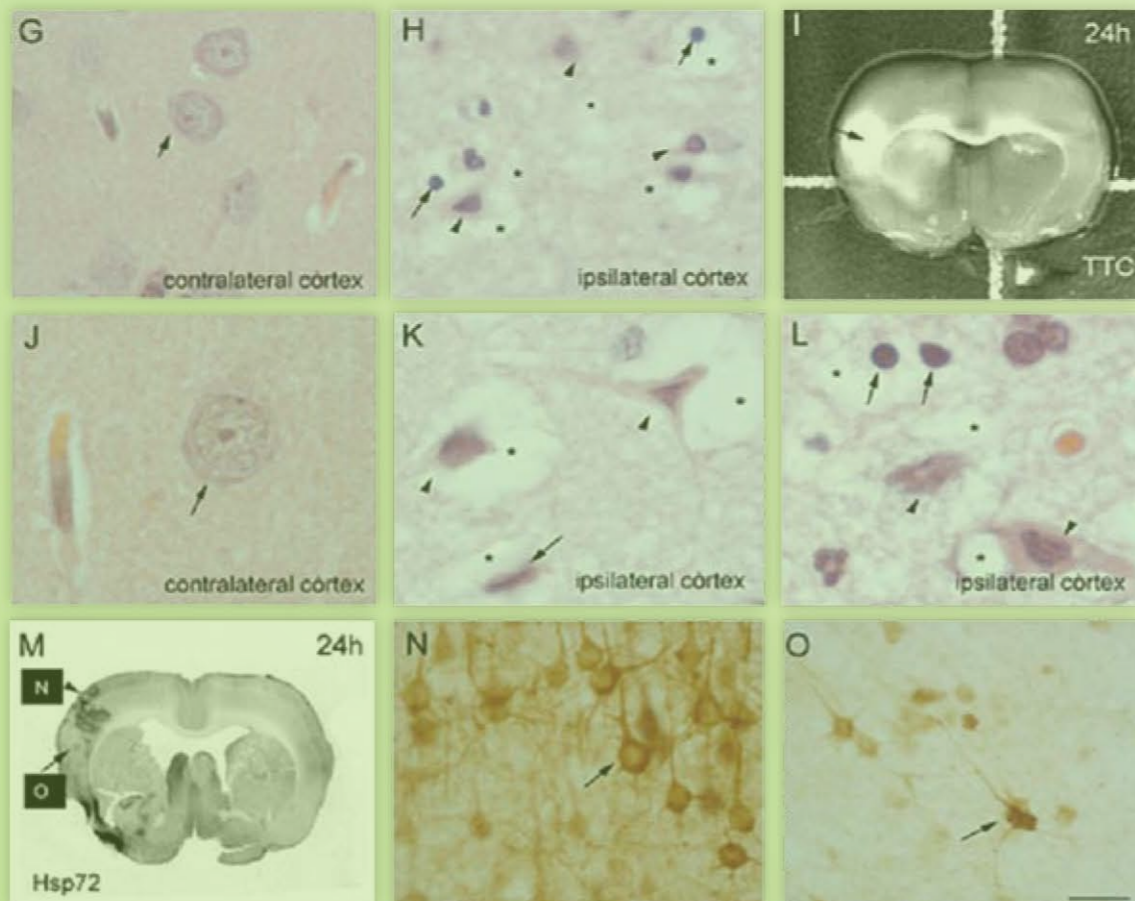
Santiago Rojas Codina



Va néixer a Barcelona el 1980. És llicenciat en Biologia (2002) i en Medicina (2007), per la UAB. Es va

iniciar en la recerca a la Unitat de Fisiologia Animal de la Facultat de Ciències de la UAB, sota la direcció del Dr. Juan Hidalgo, treballant en el camp de la inflamació en el sistema nerviós central; aquesta col·laboració es manté de forma ininterrompuda fins al 2003, moment en què va iniciar la tesi doctoral en biologia en el Departament de Farmacologia i Toxicologia de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, sota la direcció de la Dra. Anna Planas. Des de 2001 fins a l'actualitat ha mantingut col·laboració activa amb la Unitat d'Anatomia Humana de la Facultat de Medicina de la UAB, sota la direcció del Dr. Alfonso Rodríguez Baeza i del Dr. Josep Ma Domènech Mateu. Ha publicat set treballs de recerca en revistes internacionals.

Figura 5. Correlació histopatològica amb les corresponents alteracions en la MRI a les 24 hores. Es pot observar la panecrosi en el territori afectat. En aquest moment ja no hi ha diferències entre el còrtex i l'estriat. L'expressió de l'HSP72 es limita en aquest moment a les neurones de la zona marginal de l'infart i a algunes cèl·lules de fenotip no neural.



Premi de recerca per a estudiants

- 1r Premi 1000 euros
- 2n Premi 500 euros
- 3r Premi 300 euros

Requisit bàsic: Ser estudiant de 1r o 2n cicle de Medicina, Biologia, Bioquímica, Farmàcia, Química o Biotecnologia.

Convocatòria oberta del 15 d'octubre 2007 al 27 de març 2008

Per a informació i sol·licituds
www.gemmarr.org
premiqrr@yahoo.com

