

Estandarización de un Modelo de Isquemia por Oclusión de la Arteria Cerebral Media en Ratas

Yanier NUÑEZ FIGUEREDO ¹, Juana TILLÁN CAPÓ ¹,
Viviana BUENO PAVÓN ¹, Carmen CARRILLO DOMÍNGUEZ ¹,
Narda M. JIMÉNEZ ALEMÁN ² & Odalys VALDÉS MARTÍNEZ ¹

¹ UCTB Control Biológico y ² Dpto. de Tecnologías Complejas,
Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM),
17 N° 6208 e/ 62 y 64 Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN. El desarrollo y estandarización de biomodelos de isquemia cerebral para evaluar compuestos neuroprotectores es una necesidad imperante en numerosos grupos de investigación. La oclusión de la arteria cerebral media en ratas ha sido uno de los más empleados, sin embargo, este biomodelo es fuente de gran variabilidad ocasionada por diferentes factores. El presente trabajo establece las condiciones experimentales óptimas para lograr respuestas confiables y repetibles en nuestro laboratorio, y pueden facilitar a otros grupos la estandarización de este valioso modelo. Las mejores condiciones establecidas fueron 2 h de oclusión de la arteria cerebral media y 48 h de perfusión, obteniendo una lesión isquémica caracterizada por evaluaciones conductuales, macroscópicas e histopatológicas.

SUMMARY. The development of animal models in stroke to evaluate neuroprotective agents is a serious need for many research groups. The middle cerebral artery occlusion in rats has been one of the most employed, although this model is associated with a great variability in the results. The present research establishes the optimum experimental conditions to obtain good experimental results in our model, and it can facilitate to other groups the standardization of this valuable model. The better conditions established were 2 h of the middle cerebral artery occlusion and 48 h of reperfusion, obtaining an ischemic injury characterized by behaviour test, macroscopic and histopathological evaluations.

INTRODUCCION

Los accidentes cerebrovasculares son la tercera causa de muerte y la primera causa de incapacidad permanente de los países desarrollados, originando altos costos sociales y financieros ¹. Aproximadamente el 20% de los pacientes con isquemia no sobreviven por un periodo superior a 1 mes y la tercera parte de los pacientes llegan a los 6 meses y se convierten en personas dependientes de otras ². A pesar de la elevada incidencia de esta patología y de sus graves consecuencias, en la actualidad no existe un medicamento capaz de revertir o evitar las secuelas que se presentan durante un ataque cerebral isquémico. Posiblemente esta sea la principal razón por la cual la isquemia cerebral en la práctica clínica ha estimulado el desarrollo de

diversos modelos experimentales en sus diferentes formas: global y focal, completa e incompleta, permanente o transitoria, ya sea para estudiar su fisiopatología o para probar nuevas medidas terapéuticas ³.

De los diferentes roedores de experimentación, ha sido en la rata en la que durante los últimos años se ha obtenido la más detallada información acerca de la organización normal de varios sistemas de neurotransmisores, neuroquímica y neurofarmacología ^{4,5}. La oclusión de la arteria cerebral media en rata, constituye un biomodelo ampliamente utilizado para simular los eventos neuro-fisiopatológicos presentes en la isquemia cerebral focal en humanos ⁶. A pesar de esto, la complejidad quirúrgica de este modelo, asociado con la alta mortalidad y la nece-

PALABRAS CLAVE: Isquemia cerebral, Modelos animales, Neuroprotección, Oclusión de la arteria cerebral media, Ratas.

KEY WORDS: Cerebral stroke, Animal models, Neuroprotective, Middle cerebral artery occlusion, Rats.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: yaniernf@infomed.sld.cu

sidad de contar con equipos y material quirúrgico especializado, muchas veces constituye una limitante para la reproducción satisfactoria del mismo en nuestros laboratorios.

El presente trabajo está dirigido a estandarizar en nuestras condiciones experimentales el modelo de isquemia focal en ratas, para que pueda ser empleado en la evaluación de fármacos neuroprotectores, y al mismo tiempo, que la información generada le facilite a otros grupos de investigación, la incorporación de este biomodelo para el estudio de posibles fármacos o compuestos para el tratamiento de la isquemia cerebral.

MATERIALES Y METODOS

Animales

En el montaje del biomodelo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media (OACM) se emplearon ratas machos de la línea Wistar, cuyos pesos oscilaron entre 270 a 300 g de masa corporal procedentes de la colonia de la UCTB Control Biológico del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Las mismas fueron alojadas en salas con condiciones de temperatura controlada de 22 ± 2 °C, cama con viruta con cambio cada 48 h y fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Fueron alimentados con pienso comercial pelletizado CMO 1000, dieta proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Habana, Cuba), y agua acidulada a libre demanda. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con las normas establecidas por el consejo canadiense para el uso y cuidado de animales de experimentación ⁷.

Procedimiento experimental

En el inicio del ensayo los animales fueron distribuidos al azar en 7 grupos experimentales siguiendo el esquema de la Tabla 1.

Posteriormente se anestesiaron con una mezcla de clorhidrato de ketamina 100 mg/Kg y diazepam 0.3 mg/Kg, por vía intraperitoneal. A continuación se les realizó una incisión en la línea media de la cara anterior del cuello de aproximadamente 3 cm a partir de la horquilla esternal, se expuso la arteria carótida izquierda común y se realizó la disección de la misma en sentido cefálico hasta llegar a su bifurcación y localizar la arteria carótida interna (ACI), externa (ACE), la occipital (AO) y la pterigoidea (AP).

Las arteria carótida externa (ACE) y arteria carótida común (ACC) fueron ligadas mientras

Grupos	Tiempo de OACM	Tiempo de reperusión	Número de Animales
I	1 hora	24 h	10
II		48 h	10
III		72 h	10
IV	2 h	24 h	10
V		48 h	20
VI		72 h	10
VII0 (falsos operados) Grupo Sham			

Tabla 1. Esquema de distribución en cada uno de los grupos experimentales.

que la arteria pterigopalatina (AP) fue clampeada. Con una microtijera se realizó una pequeña arterioectomía en la cara anterior de la ACC y se introdujo lentamente en el vaso un filamento de nailon 4/0 con la punta ovalada en dirección a la base del cráneo hasta que se observó una pequeña resistencia al recorrido del filamento, como indicativo de la oclusión de la arteria cerebral media (ACM). El filamento de nailon fue retirado al cabo de 1 ó 2 h, según el grupo experimental y posteriormente se suturó la incisión. Durante el período de recuperación de los animales operados se mantuvo una temperatura corporal constante de 37 °C ^{3,8,9}.

Se realizó la evaluación neurológica de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, al inicio e inmediatamente antes del sacrificio. Para ello se empleó una escala neurológica de 6 puntos como sigue ⁸⁻¹⁰: 0 = animales normales, 1 = dificultad para extender la pata izquierda totalmente, 2 = caminata en círculo hacia la izquierda, 3 = caída hacia la izquierda, 4 = locomoción no espontánea con depresión en el nivel de conciencia y 5 = muerte.

Luego del sacrificio se utilizaron 10 animales de los grupos correspondientes a 1 h de OACM con 24, 48 y 72 h de reperusión y de 2 h de OACM con 24 y 48 h de reperusión, mientras que del grupo correspondiente a 2 h de OACM y 72 h de reperusión solo fueron empleados 3 animales. Todos ellos fueron reperfundidos transcárdialmente con 20 mL de solución salina a 4 °C, sus cerebros fueron removidos y colocados a 0 °C durante 30 min.

Pasado este tiempo se realizaron 6 cortes del cerebro de 2 mm de grosor (+5.20 a -6.30 referente al Bregma) se colocaron en una solución de 2,3,5 cloruro de trifeníltetrazolio (TTC, Sigma) al 2% en cloruro de sodio al 0,9 % a 37 °C e incubados en la oscuridad durante 30 min. Los mismos fueron escaneados y analizados con la

ayuda del programa Photoshop, versión, 7.0. Las áreas infartadas (cortical y subcortical) no teñidas fueron calculadas de manera individual para cada corte. El volumen de infarto de cada corte se calculó multiplicando su área por el grosor del corte (2 mm). El volumen de infarto total por cada región (cortical o subcortical) fue obtenido sumando los volúmenes individuales de los cortes de cada una. El volumen de infarto total fue obtenida a partir de la suma de los volúmenes anteriores ^{3,9}.

A partir de los resultados de área de infarto, volumen de infarto y parámetros neurológicos evaluados en cada uno de los grupos, se seleccionó el mejor tiempo de oclusión y reperusión. Posteriormente, otros 10 animales fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico bajo las condiciones de oclusión y reperusión escogidas, los cuales fueron reperfundidos con 20 mL de formol neutro al 10% con el objetivo de realizar el estudio histopatológico de sus diferentes zonas cerebrales (cortes de 6 µm) empleando el método de tinción con Hematoxilina de Harris regresiva y eosina alcohólica. Igual número de animales del grupo falsamente operado (Sham) fueron sometidos al estudio histopatológico anterior.

El procesamiento de las muestras fue realizado en un procesador automático de tejidos, marca Histokinette Sakura que contiene doce vasos: 4 de alcoholes de gradación creciente (deshidratación), 4 de xiloles (aclaramiento) y 4 de parafinas licuadas (imbibición), durante 1,5 h. El criterio de lectura al observar al microscopio óptico fue: presencia de daño celular, gliosis, necrosis, edema y pérdida neuronal en diferentes zonas cerebrales ¹¹. El examen de las preparaciones histológicas fue realizado por un patólogo, sin la previa información acerca de la identificación de los grupos. Para ello se utilizó un microscopio óptico Marca Olympus. Toda la información fue procesada en una microcomputadora Pentium 4.

Todas las variables fueron procesadas en el programa estadístico GraphPad InStat para obtener los valores medios y el error estándar de la media. Se determinó la distribución normal de los datos mediante un Test de Bartlett. Los datos que mostraron distribución normal fueron comparados mediante un ANOVA de clasificación simple y Test de Comparación Múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Algunas variables fisiológicas tales como temperatura corporal, flujo sanguíneo cerebral y

la presión arterial deben ser monitoreadas. Por falta del equipamiento necesario en el laboratorio, en este trabajo fue imposible realizar estas determinaciones, no obstante, estas consideraciones deben ser tomadas en cuenta para la obtención de resultados más confiables

RESULTADOS

En la Figura 1 se pone de manifiesto mediante la tinción con TTC al 2% el daño del tejido cerebral causado por los diferentes tiempos de oclusión de la ACM y de reperusión y en animales falsos operados. En la misma se observan las fotografías representativas del área cerebral de un animal de cada grupo (falso operado; 1 hora de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperusión y 2 h de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperusión), seccionadas en seis cortes y teñidas con TTC al 2%. Se puede apreciar que en el grupo falso operado toda el área cerebral se encuentra teñida a diferencia del resto de los grupos donde aparecen indistintamente zonas teñidas en menor o mayor grado. Las mayores áreas de infarto fueron observadas en los grupos de 2 h de oclusión de la arteria cerebral media y reperfundidos a las 48 h o 72 h (Fig. 1 F y G, respectivamente), manifestándose una extensa área de infarto que incluye la zona cortical y subcortical.

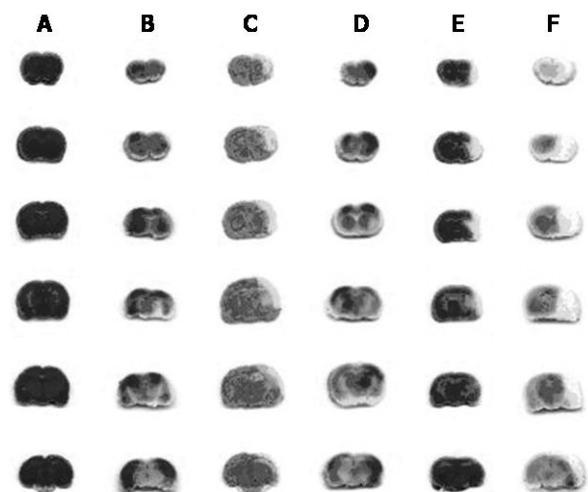


Figura 1. Cortes (6) de áreas cerebrales representativa de cada grupo (sham y con OACM) teñidas con TTC 2%. **A:** Animales falsamente operados (SHAM), **B:** Animales sometidos a 1 h de OACM y 24 h de reperusión, **C:** Animales sometidos a 1 h de OACM y 48 h de reperusión, **D:** Animales sometidos a 1h de OACM y 72 h de reperusión, **E:** Animales sometidos a 2h de OACM y 24 h de reperusión, **F:** Animales sometidos a 2h de OACM y 48 h de reperusión, **G:** Animales sometidos a 2 h de OACM y 72 h de reperusión.

En la Figura 2 se representan los valores medios de áreas de infarto (medias $\pm$ desviación estándar) de la zona subcortical de los diferentes cortes realizados al cerebro de cada animal correspondiente a los grupos evaluados (falso operado); 1 hora de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperfusion y 2 h de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperfusion). En la Figura 3 se muestran los valores medios de las áreas de infarto (media $\pm$ desviación estándar) de la zona cortical de los diferentes cortes realizados al cerebro de cada animal correspondiente a los grupos evaluados (falso operado; 1 hora de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperfusion y 2 h de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperfusion). Las áreas de daño cerebral subcortical y cortical correspondientes a los animales sometidos a 2 h de OACM y 48 h de reperfusion y a los animales con 2 h de OACM y 72 h de reperfusion, fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) con respecto a los cortes del cerebro de los animales del resto de los grupos experimentales (Figs. 2 y 3).

El volumen total medio de las zonas subcortical y cortical infartadas se representa en la Figura 4, en la que se puede apreciar un comportamiento similar al obtenido en las figuras de las áreas calculadas (Figs. 2 y 3) donde el mayor daño cerebral caracterizado por edema se produjo en los animales sometidos a 2 h de OACM y 48 ó 72 h de reperfusion. El episodio de isquemia de 1 h de oclusión y 24, 48 y 72 h de reperfusion inducido en las ratas de la línea Wistar tuvo como resultado un volumen de infarto de 29,84, 34,48 y 58,38 mm³, respectivamente; en cambio la oclusión de 2 h de la ACM con los mismos tiempos de reperfusion dio como resultado un volumen de infarto de 84,36, 294,33 y 587,36 mm³.

El comportamiento de los animales someti-

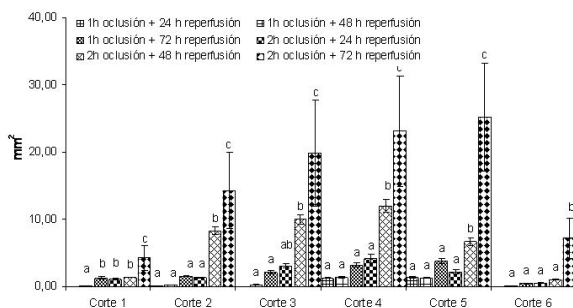


Figura 2. Áreas medias $\pm$ error estándar de la media de la zona subcortical infartada de los diferentes cortes realizados al cerebro de los animales de cada uno de los grupos ensayados. (Letras desiguales denotan diferencias significativas en cada uno de los cortes para $p < 0,05$). El grupo Sham no presentó área de infarto.

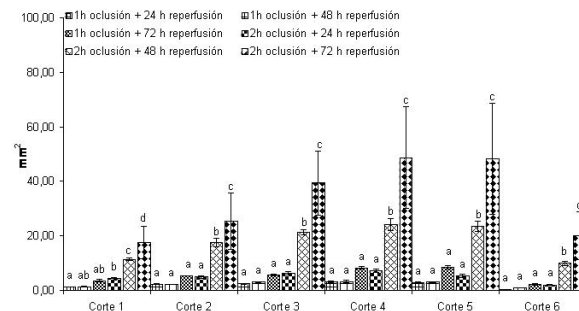


Figura 3. Áreas medias $\pm$ error estándar de la media de la zona cortical infartada de los diferentes cortes realizados al cerebro de los animales de cada uno de los grupos ensayados. (Letras desiguales denotan diferencias significativas en cada uno de los cortes para $p < 0,05$). El grupo Sham no presentó área de infarto.

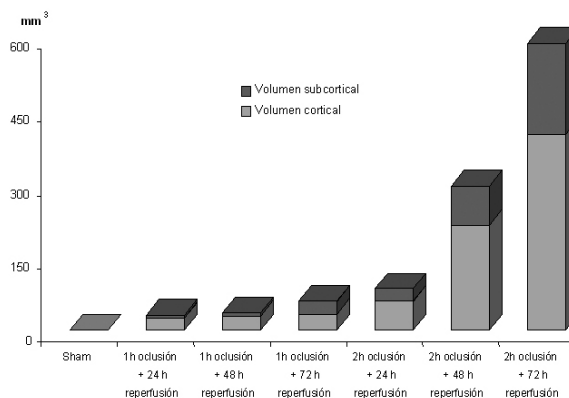


Figura 4. Volumen total medio de las zonas cerebrales subcortical y cortical de cada uno de los grupos evaluados (Sham, 1 hora de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperfusion y 2 h de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperfusion).

dos a los diferentes tiempos de oclusión y reperfusion fue evaluado mediante el índice de daño neuronal (IDN) establecido por Longa *et al.*¹⁰, el cual mostró un incremento significativo ($p < 0,05$) para las 2 h de OACM dependiente del tiempo de reperfusion, mientras que el grupo sometido a una hora OACM solo mostró diferencia significativa para el tiempo de reperfusion de 72 h con respecto a las 24 y 48 h de reperfusion. En la Figura 5 se observa la ecuación de las líneas de tendencia para cada una de las curvas del índice de daño neuronal (1 y 2 h de OACM), cuyos coeficientes de correlación fueron significativos ($p < 0,05$) con valores superiores a 0,9. De los resultados mostrados hasta el momento se ha podido apreciar que las óptimas condiciones experimentales en cuanto a reproducibilidad del daño isquémico se alcanzaron empleando un tiempo de OACM de 2 h y un tiempo de reperfusion de 48 h (Fig. 6).

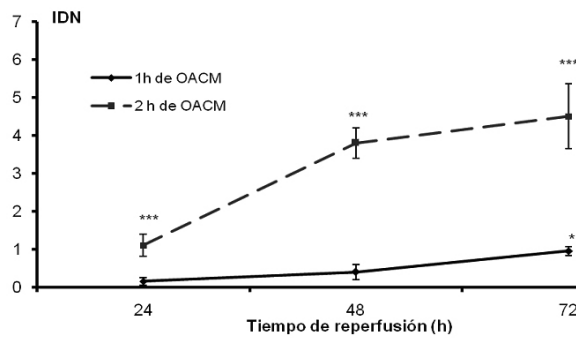


Figura 5. Índice de daño neuronal (IDN) de los animales con 1 hora de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperusión y 2 h de oclusión de la ACM con 24, 48 y 72 h de reperusión. *Difiere para $p < 0,05$ con respecto al grupo falso operado (IDN = 0). ** Difiere para $p < 0,001$ con respecto al grupo falso operado (IDN=0).

En la observación microscópica del tejido correspondiente al hipocampo del cerebro de animales sometidos a 2 h de OACM con 48 h de reperusión se identificó la presencia de picnosis, edema, áreas de necrosis, gliosis y pérdida de neuronas, en las zonas CA1, CA2, CA3 y giro dentado. En el grupo de falsos operados no se presentaron alteraciones visibles (Fig. 7).

DISCUSIÓN

La oclusión de la ACM es la causa más común de todos los tipos de isquemia en humano. La introducción intraluminal de una sutura de

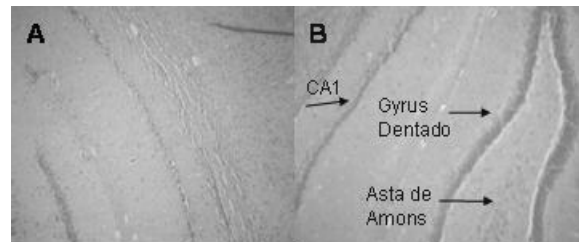


Figura 7. Vista panorámica de un corte de tejido cerebral de rata (A) La imagen muestra la zona hipocampanal de un animal sometido a 2 h de OACM y 48 h de reperusión. (B) Zona hipocampanal de un animal falsamente operado. (100 X, H/E).

naíl para ocluir la ACM ha constituido el modelo animal más ampliamente utilizado para estudiar fármacos neuroprotectores, a partir de la década del 90. El procedimiento quirúrgico no requiere craniotomía y muchos de los cambios fisiopatológicos originados se corresponden con los observados en el hombre¹². Básicamente, la irrigación arterial de los hemisferios cerebrales de la rata es similar a la del humano, cada uno posee arterias cerebrales anterior (ACA), media (ACM) y posterior (ACP), que originan ramas corticales y perforantes³⁻¹⁰.

Muchos son los factores que pueden afectar los resultados obtenidos en los biomodelos de isquemia cerebral por oclusión de la ACM, entre los más frecuentes tenemos: la especie y línea animal empleada, la experiencia de la persona

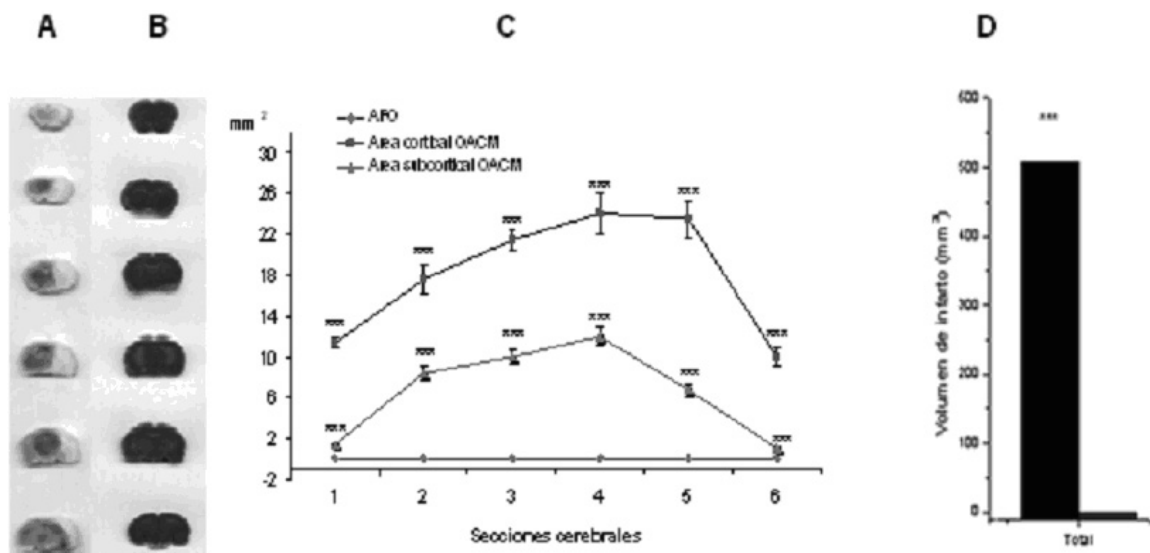


Figura 6. A: Tinción con TTC 2% de 6 cortes cerebrales después de 48 h de reperusión y 2 h de oclusión de ACM. B: Tinción con TTC 2% de 6 cortes cerebrales de animales falsos operados (Sham) C: Cuantificación del área de infarto cortical y subcortical de 6 secciones de cerebro de animales sometidos a 2 h de OACM y 48 h de reperusión (***) diferencia significativa $p < 0,001$ con respecto a los animales falsos operados - AFO). D: Volumen de infarto total de animales sometidos a 2 h de OACM y 48 h de reperusión (***) diferencia significativa $p < 0,001$ con respecto a los animales falsos operados - AFO).

que lleva a cabo los experimentos, el estrés al que están sometidos los animales, el tipo de abordaje empleado para lograr la oclusión de la ACM, la temperatura corporal adecuada para la recuperación de la operación, el tiempo de oclusión y el de perfusión al que son sometidos los animales ^{6,8}.

Ginsberg & Busto ¹³ plantean que los animales genéticamente hipertensos (razas SHR y stroke-prone SHR) son los más adecuados para desarrollar un mayor tamaño de infarto y una menor variabilidad del mismo. Sin embargo, las diferencias morfológicas y fisiológicas respecto a las líneas normotensas hacen que estos animales no sean los más adecuados para el estudio de terapias neuroprotectoras debido a la posible variabilidad en la respuesta que pudieran mostrar a los tratamientos. En esta investigación fue seleccionada la línea de ratas Wistar; ya que según lo reportado por Fox *et al.* ¹⁴ y Pérez ¹⁵, esta línea presenta una mayor homogeneidad en cuanto a tamaño de infarto y reproducibilidad, respecto a la raza Sprague-Dawley. Una posible explicación de ello se encuentra en la elevada variabilidad anatómica de la arteria cerebral media descrita en ratas Sprague-Dawley ¹⁴. Además, dentro de las posibles fuentes de variación, algunos autores han llegado a indicar la existencia de diferencias en la respuesta a la isquemia dentro de la misma raza dependiendo del suministrador, e incluso entre diferentes envíos del mismo suministrador ¹⁶, por lo que se hace imprescindible caracterizar previamente a la realización de cualquier estudio, el modelo que se pretende emplear, esto justifica la necesidad de desarrollo del modelo de isquemia cerebral por oclusión de la ACM en nuestro laboratorio.

En este trabajo, la oclusión intraluminal fue realizada con un monofilamento de nailon 4/0, sutura que coincide con las empleadas por numerosos grupos ^{3,9,10,15,17} para el mismo modelo de OACM. La sutura puede ser dejada en el lugar por un tiempo de duración variable y luego removida para producir la perfusión. Las duraciones más comunes de oclusión de la ACM en rata son de 60, 90, 120 y 180 min mientras que los de perfusión oscilan entre 20 a 72 h posterior a la oclusión ^{10,15,17,18}; los tiempos de oclusión (1 y 2 h) y perfusión (24, 48 y 72 h) empleados en este trabajo se encuentran dentro de los tiempos reportados.

El TTC es una sal de tetrazolio que es usada tradicionalmente en la determinación del volumen de infarto inducido en animales de experimentación a la concentración de 2% en cloruro

de sodio al 0.9% por un período de 30 min a temperatura ambiente ^{19,20}. Normalmente este es incoloro, pero cuando reacciona con las enzimas mitocondriales de las células del tejido cerebral (especialmente con succinil deshidrogenasa), es reducido produciendo una coloración roja oscura que tiñe la región cerebral no infartada, mientras que el tejido del área infartada cuyas enzimas mitocondriales se encuentran dañadas, no es teñido y permanecen blancas (blanco pálido), resultando un excelente contraste entre las áreas cerebrales infartadas y las que permanecen intactas ²¹. Esto permite calcular el área y volumen de infarto inducido en los animales sometidos a la OACM en el presente modelo. Su uso es recomendado entre 6 y 72 h después de la isquemia. Cuando es usado antes de las 6 h posterior a la inducción de la isquemia, esta técnica no refleja de forma segura toda la extensión del tejido dañado, porque la destrucción de las enzimas mitocondriales requieren tiempo ²², aunque en experiencias realizadas por Tatlisumak *et al.* ²³, observaron que el TTC puede ser usado confiadamente 4 h después de la oclusión de la ACM tanto en los modelos de isquemia transitoria y permanente. Después de 72 h, el volumen de infarto determinado por la tinción de TTC puede ser desestimado porque varias células se infiltran hacia la periferia de la región infartada y las enzimas mitocondriales en estas células reaccionan con el TTC produciendo un oscurecimiento en los bordes infartados resultando un falso positivo en el ensayo realizado. En el presente trabajo, los tiempos de perfusión evaluados en el modelo de oclusión transitoria de la ACM en ratas, fueron de 24, 48 y 72 h después de cada uno de los tiempos de oclusión (1 y 2 h), por lo que los resultados obtenidos son confiables en la estandarización del modelo en nuestro laboratorio según lo recomendado por Liszczak *et al.* ²² y Tatlisumak *et al.* ²³.

El patrón más consistente de muerte celular en el modelo de OACM sigue una progresión bien descrita de infarto temprano en el estriado y más tarde en la corteza dorsolateral. Posteriormente al transcurso de los cinco min causa la muerte de casi todas las neuronas de las células piramidales CA1, mientras que después de 20 min causa la muerte celular en neuronas CA3 y con menor efecto sobre células del gyrus dentado en el hipocampo ^{6,23}. El infarto en el estriado es mayormente necrótico y ocurre rápidamente, no responde a la mayoría de los agentes neuroprotectores administrados después del procedi-

miento. El infarto en la zona cortical es mucho más retardado, incluye una apertura prolongada y bifásica del flujo sanguíneo cerebral y contiene muchas menos células muertas que en el infarto del estriado ²⁶. En la OACM con perfusión, el estriado permanece densamente isquémico, en cambio el control del flujo sanguíneo en la corteza retorna cercano a su valor ²⁶. Por tanto en la OACM el infarto del estriado es un núcleo isquémico y el infarto cortical es una región de retardo con muerte neuronal progresiva o una penumbra isquémica ¹⁸. En el estudio ejecutado se observa que a medida que se avanzan en los cortes realizados, a partir del Bregma, y posteriormente teñidos con TTC al 2%, los daños sobre las estructuras anteriormente descritas, se van haciendo más evidentes, principalmente en el grupo de animales sometidos a 2 h de oclusión de la ACM con 48 y 72 h de perfusión cuyos daños fueron mayores. En cambio, en los grupos de animales sometidos a 1 hora de OACM seguidos de 24, 48 y 72 h de perfusión, se observó que los daños se circunscribieron fundamentalmente a la región cortical en cada uno de los cortes, igual comportamiento mostraron los animales sometidos a 2 h de OACM con 24 h de perfundidos, lo que habla a favor de una menor reproducibilidad del biomodelo, dado el grado parcial de daño isquémico.

Al someter ratas de la misma línea que la nuestra a 90 min de isquemia por OACM y 72 h de perfusión, Pérez ¹⁵ obtuvo como resultado un volumen de infarto de 185,7 mm³, mientras que Aspey *et al.* ²⁷, utilizando un tiempo de oclusión de 2 h seguido de 22 ó 70 h de perfusión obtuvieron un valor de 151,7 mm³ y 238,0 mm³, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que el tiempo de perfusión incrementa el tamaño del infarto.

En trabajos realizados por Pérez ¹⁵ utilizando 2 h de OACM, se encontró una mortalidad postquirúrgica cercana al 40%, mientras que ASPEC ²⁷ no reportó mortalidad para el mismo tiempo. En nuestro estudio no se obtuvo mortalidad en los grupos con 1 hora de oclusión, ni en los de 2 h de oclusión seguido de 24 y 48 h de perfusión, en cambio en el grupo de animales sometidos a la OACM de 2 h y 72 h de perfusión el porcentaje de mortalidad fue de un 70%, este resultado puede estar relacionado con un mayor tiempo de exposición de las diferentes áreas cerebrales a los agentes neurotóxicos después de la reperusión ²⁸⁻³².

Lipton ⁶ plantea que luego de un episodio is-

quémico, el infarto comienza en el núcleo, pero después de 6-24 h en caso de que el daño continúe este se incrementará a la región de penumbra. Pasado un día este continuará creciendo, y entre 24 y 72 h se incrementará alrededor de un 30%. Entre 10 y 20 min de isquemia temporal se produce en la zona del núcleo un esparcimiento de neuronas muertas, mientras que una hora conduce al infarto. El desarrollo del infarto en la zona de penumbra se desarrolla cuando la oclusión es posterior a las 2 h. En este trabajo se puso a relieve que a medida que aumenta el tiempo de perfusión con una oclusión de 2 h el área de infarto tanto cortical como subcortical se va incrementando. Los déficit conductuales producidos por la isquemia provienen del daño neuronal de circuitos específicos de una función determinada del cerebro. Es importante destacar que el tamaño del infarto producido debe ser enfocado de forma independiente de los circuitos que fueron dañados ¹⁸. Ginsberg ³³ menciona la necesidad de relacionar la severidad y duración del déficit neurológico después de la isquemia cerebral experimental y especialmente los efectos de la perfusión. Lo anteriormente expuesto es posible corroborarlo en el estudio realizado, en el cual, las ratas sometidas respectivamente a 1 y 2 h de oclusión seguido de 24, 48 y 72 h de perfusión, mostraron IDN según lo detallado en la Figura 5. Las manifestaciones correspondientes a la locomoción no espontánea con depresión en el nivel de conciencia fueron los que se pusieron de manifiesto en mayor cuantía en el grupo de animales con 2 h de oclusión seguida de 48 h de perfusión, mientras que en los animales con 72 h de perfusión mostraron una elevada mortalidad como anteriormente se explicó. Cabe resaltar que en el inicio del experimento, los animales de todos los grupos evaluados presentaron comportamientos conductuales y locomotores normales. Las evaluaciones realizadas demostraron que el esquema de tratamiento de 2 h de OACM y 48 h de perfusión resultó ser el que mejor reproduce el daño isquémico en cuanto área y volumen de infarto, índice de daño neuronal y supervivencia de los animales para nuestras condiciones experimentales por lo que fue seleccionado para el análisis histopatológico de su tejido cerebral de esa forma culminamos la estandarización del biomodelo.

La isquemia focal produce una extensa área de daño neuronal caracterizado fundamentalmente por necrosis, en la que la muerte neuronal es acompañada por gliosis, muerte de célu-

las vasculares y pérdidas de elementos celulares, aspectos que fueron observados en el presente estudio histológico de los animales sometidos a 2 h de OACM con 48 h de reperusión. En la fase temprana, la espongiosis y el incremento de la celularidad son rasgos prominentes, las neuronas aparecen truncadas. En la fase tardía las neuronas están irreversiblemente dañadas y aparecen eosinófilos. Los resultados del estudio histopatológico realizado al grupo de animales, coinciden con los reportados por otros grupos ^{11,24}.

Nuestros resultados muestran tanto la metodología empleada como las condiciones experimentales necesarias para lograr respuestas reproducibles y confiables, así como propias de un proceso hipóxico después de la oclusión de la ACM en ratas. Según nuestros hallazgos, en las condiciones experimentales de nuestra UCTB, los mejores resultados se logran empleando un tiempo de oclusión de la ACM de 2 h y un tiempo de reperusión de 48 h.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dávila, C.A., Betancourt M.E., G.P. Gómez & H.P. Jiménez (2004) *Rev. Neurol.* **39**: 156-65.
- Warlow, C.P. (1998) *Lancet* **352** (Suppl.3): SI-III-4.
- Peña, P.G., A.H. Díaz & J.L. Torres (2004) *Ver. Neurol.* **39**: 1011-6.
- Coert, B.A., R.E. Anderson & F.B. Meyer (1999) *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **8**: 380-7.
- Hossmann, K.A. (1998) *Cardiovasc. Res.* **39**: 106-20.
- Lipton, P. (1999) *Physiol. Rev.* **79**: 1432-568.
- Olfert, E.D., B.M. Cross & A.A. Mc William (1998) "Manual sobre el cuidado y uso de los animales de Experimentación", Consejo Canadiense de protección de los Animales. <<http://www.ccac.ca>>.
- Tamura, A., D.I. Graham & G.M. Teasdale (1981) *J. Cereb. Blood Flow. Metabol.* **1**: 53-60.
- González, A., J. E.C. Jalil, M. García & O. León (2003) *Brain Res.* **990**: 1-7.
- Longa, E.Z., Weinstein, P.R., S. Carlson & R. Cummins (1989) *Stroke.* **20**: 84-91.
- Bar-Joseph, A., Berrovitch, Y., J. Adamchick & A. Biegon (1994) *Mol. Chem. Neuropathol.* **23**: 125-35.
- Sayed, I., Guo, Q., S.W. Hoffman & D.G. Stein (2006) *Ann. Emerg. Med.* **47**: 381-9.
- Ginsberg, C. & R. Busto (1989) *Stroke.* **20**: 1627-42.
- Fox, G., D. Gallacher, S. Shevde, J. Loftus & G. Swayne (1993) *Stroke.* **24**: 2087-93.
- Pérez, F.J. (2005) "Isquemia cerebral focal transitoria en rata: caracterización y utilidad del modelo de la sutura intraluminal en el estudio de estrategias neuroprotectoras", Universitat de Valencia, Trabajo en opción a Doctorado.
- Pulsinelli, W.A. & A.M. Buchan (1988) *Stroke.* **19**: 913-4.
- Xiaofan, Chu, Qi Chuanjie, Zou Liangyu & Fu Xuejun (2008) *J. Neurosci. Met.* **168**: 1-7.
- Carmichael, S.T. (2005) *NeuroRx.* **2**: 396-409.
- Bederson, J.B., L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis & H. Bartkowski (1986) *Stroke.* **17**: 472-6.
- Lundy, E.F., B.S. Solik, R.S. Frank P.S. Lacy, D.J. Combs, G.B. Zelenock & L.G. D'Alecy (1986) *J. Pharmacol. Meth.* **16**: 201-14.
- Li, F., K. Irie, M.S. Anwer & M. Fisher (1997) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**: 1132-5.
- Liszcak, T.M., E.T. Hedley-Whyte, J.F. Adams, D.H. Han, V.S. Kolluri, F.X. Vacanti, R.C. Heros & N.T. Zervas (1984) *Acta Neuropathol.* **65**: 50-157.
- Tatlisumak, T., F. Li & M. Fisher (2007) "Animal Models of Ischemic Stroke" (A. Bhardwaj, N.J. Alkayed, J.R. Kirsch & R.J. Traystman, ed.), Sección III, Informa Healthcare USA, Inc. New-York. Págs. 171-262.
- Garcia, J.H., K.F. Liu & K.L. Ho (1995) *Stroke.* **26**: 636-42.
- Williams, A.J., R. Berti, J.R. Dave, P.J. Elliot, J. Adams & F.C. Tortella (2004) *Stroke.* **35**: 1186-91.
- Takagi, K., W. Zhao, R. Busto & M.D. Ginsberg (1995) *Brain Res.* **691**: 160-8.
- Aspey, B.S., F.L. Taylor, M. Terruli & J.G. Harrison (2000) *Neuropathol Appl Neurobiol.* **26**: 232-4.
- Huang, J., i M. Urvash, B.S. Upadhyay & R.J. Tamargo (2006) *Surgical Neurology* **66**: 232-45.
- Castillo, J. (2000) "Fisiopatología de la isquemia cerebral" *Ver. Neurol.* **30**: 459-64.
- Peters, O., T. Back, U. Lindauer, C. Busch, D. Megow, J. Dreier & U. Dirnagl (1998) *J Cereb Blood Flow Metab.* **18**: 196-205.
- Chan, P.H. (2001) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**: 2-14.
- Stewart, V.C. & J.R. Heales (2003) *Free Rad. Biol. Med.* **34**: 287-303.
- Ginsberg, M.D. (1995) "Neuroprotection in brain ischemia: an update" (part I). *Neurosci-*