Establecimiento de un modelo de isquemia cerebral focal permanente en dos líneas de ratas para evaluación de posibles agentes neuroprotectores

Autores:

Nelvys Subirós Martínez[1*], Rosa M. Coro Antich[2], Héctor Pérez Saad[3], Jorge A. Berlanga Acosta[4], Sandra Rodríguez Salgueiro[5], Diana García del Barco Herrera[6*]

1 Investigador agregado, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba
2 Investigador Titular, Centro Nacional de Información Médica, La Habana, Cuba
3 Investigador Titular, Instituto de Neurología y Neurocirugía, La Habana, Cuba
4 Investigador Titular, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba
5 Investigador Auxiliar, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba
6 Investigador Auxiliar, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba
nelvys.subiros@cigb.edu.cu

* Igual contribución

RESUMEN

La investigación de la isquemia cerebral focal requiere de modelos animales relevantes al infarto cerebral en humanos. La oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas es uno de los modelos más utilizados en estas investigaciones. Sin embargo entre las disímiles líneas de ratas existen diferencias en cuanto al volumen de infarto inducido por esta lesión. El objetivo de este trabajo fue establecer el procedimiento quirúrgico para establecer este modelo en nuestro laboratorio y determinar la línea de rata a utilizar en la futura evaluación de agentes neuroprotectores. Se formaron dos grupos de ratas Wistar y Sprague Dawley (n=10 cada uno), las cuales se lesionaron por MCAO, se evaluaron clínicamente a las 48 horas y se sacrificaron. Las áreas cerebrales infartadas se midieron con el programa ImageJ para calcular el volumen de tejido lesionado y el porciento de edema. En cuanto a la supervivencia, esta fue mayor en el grupo de ratas Wistar y el déficit neurológico fue mayor en las Sprague Dawley. Con relación al daño tisular, se observó una tendencia a un mayor volumen de infarto en la línea Wistar. El edema fue similar en los dos grupos. Conclusiones: se logró establecer el procedimiento quirúrgico para lograr una isquemia cerebral focal permanente en ratas y se seleccionó la línea Wistar para la evaluación de agentes neuroprotectores en el modelo de isquemia cerebral focal.

PALABRAS CLAVE: Isquemia cerebral focal, oclusión de la arteria cerebral media, líneas de ratas, modelo animal

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de modelos experimentales de las diferentes enfermedades humanas ha contribuido en gran medida a comprender mejor la fisiopatología de las mismas, así como a desarrollar nuevas alternativas terapéuticas y mejorar su diagnóstico. Tal es el caso de la enfermedad cerebrovascular, condición devastadora que afecta anualmente 15 millones de personas en todo el mundo, y es la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad en los adultos de países industrializados y en Cuba [4,9].

El modelo de isquemia cerebral focal permanente obtenido por la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (MCAO, por siglas en inglés) en ratas o ratones es uno de los modelos más utilizados, debido a su gran similitud con el infarto cerebral tromboembólico en humanos [12]. Sin embargo la evolución de la isquemia después de un daño por MCAO varía considerablemente entre las diferentes líneas de ratas [3], lo cual influye considerablemente en los resultados de las investigaciones en isquemia cerebral experimental. Esta variabilidad podría explicarse por factores como el anestésico empleado, el tamaño y tipo del filamento, y modificaciones de la técnica [2].

Con el propósito de crear las condiciones en nuestro laboratorio para la evaluación de agentes neuroprotectores en este modelo, nos planteamos los siguientes objetivos:

Establecer el procedimiento quirúrgico de oclusión permanente de la arteria cerebral media por inserción de un filamento de polipropileno.

Determinar posibles diferencias en la evaluación clínica y el volumen de infarto entre las líneas de ratas Wistar y Sprague Dawley (SD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el trabajo se condujo en conformidad con el programa para el uso y cuidado de animales de laboratorio para uso experimental del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba). Los protocolos se aprobaron por el Comité para el Cuidado y Uso Animal del CIGB.

Se emplearon ratas Wistar y SD (n=10 por grupo) las cuales se obtuvieron del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Los animales, alojados individualmente, se mantuvieron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas, con acceso libre al agua y la comida y se adaptaron a las condiciones de laboratorio una semana antes de iniciar el experimento.

Procedimiento quirúrgico para la isquemia cerebral focal permanente en ratas

Luego de colocar al animal en decúbito supino y fijar sus extremidades, se realizó una incisión de 3cm en la línea media de la cara anterior del cuello a partir de la horquilla esternal. Con ayuda de una sutura de seda 2/0 se aislaron las glándulas salivales y el músculo esternohioideo; esto permite visualizar el paquete vascular del cuello rodeado de tejido conectivo. La arteria carótida común (ACC) se disecó en sentido cefálico hasta la bifurcación de las arterias carótidas interna y externa (ACI y ACE), teniendo en cuenta que la rama dirigida hacia afuera es la ACI (Fig. 1A). Con seda 4/0, se ligó la base de la ACC y de la ACE para evitar el flujo retrógrado desde la ACE. Luego se procedió a colocar un microclip y una ligadura 4/0, sin ajustar alrededor de la ACI (Fig. 1B) para fijar la sutura insertada en la arteria y evitar el flujo retrógrado.

Con una microtijera, se realizó una pequeña arteriotomía en la ACC hasta obtener un ligero sangrado (indicativo que el corte incluyó todas las capas arteriales). Lentamente y con ayuda de la micropinza se introdujo el filamento de polipropileno 3/0, a todo lo largo de la ACI (Fig. 2), dirigiéndolo medialmente hacia la base del cráneo, para asegurar que no se introduzca en el tramo pterigoideo. El filamento se introdujo una distancia de 22 mm [8].

Evaluación clínica y morfológica

Luego de la oclusión permanente de la arteria cerebral media, los animales se dejaron evolucionar 48 horas. En ese momento se evaluó el déficit neurológico empleando una escala según Walberer, *et al.* (2006) y Schmid-Elsaesser *et al.* (1998) con algunas modificaciones [13,10] (Tabla 1). Luego se anestesiaron, sacrificaron y se extrajo el encéfalo. Se realizaron cortes coronales de 3 mm de grosor, los cuales se tiñeron en una solución de TTC al 0.5%, a 37^{o}C durante 20 minutos en la oscuridad.

Para el estudio morfométrico se utilizó el programa ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA). Con imágenes previamente calibradas se midieron las áreas de necrosis y el área de los hemisferios ipsilateral y contralateral a la lesión. Finalmente, el volumen de infarto y el edema se calcularon según las fórmulas de la figura 3 [6].

En el caso del volumen de infarto se introduce una corrección por la presencia de edema, muy importante en este modelo.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prisma (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Los datos de supervivencia se analizaron mediante la prueba exacta de Fischer. Las variables paramétricas fueron procesadas mediante la prueba t de student, en tanto que a las no paramétricas se

les aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Para todos los análisis se consideró un nivel de significación del 5% (α=0.05).

RESULTADOS

Se logró realizar la técnica de la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media en 17 de los animales (3 ratas Wistar murieron antes de la intervención quirúrgica por efectos del anestésico). La mayor dificultad se presentó en introducir el filamento por la ACI y no por la arteria pterigopalatina. Este aspecto se superó cuando la disección del paquete vascular se realizó hasta visualizar esta rama de la ACI. De esta manera se pudo confirmar por observación directa que el filamento se introducía por la ACI hacia la base del cráneo.

En el análisis de la supervivencia, esta fue mayor en la línea Wistar (Fig. 4A) que en la SD. En la primera, de siete animales isquémicos solo uno murió, en tanto que de las 10 ratas SD isquémicas murieron seis animales en las 48 horas posteriores a la generación del infarto.

En cuanto al déficit neurológico, este fue mayor en la línea SD (Fig. 4B). En este parámetro debemos considerar que en este grupo se produjeron seis muertes por lo que a esos animales se les asignó la máxima puntuación. De forma general, la sintomatología clínica se caracterizó por poca resistencia a un empujón lateral, movimientos circulares y en algunos casos se observó ausencia de actividad espontánea con un nivel de conciencia reducido.

Con relación al daño tisular, aunque no se registraron diferencias significativas entre las dos líneas estudiadas, se observó una tendencia a un mayor volumen de infarto en la línea Wistar (Fig. 5A). El porciento de edema fue similar en los dos grupos experimentales (Fig. 5B).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró establecer el modelo de isquemia cerebral focal permanente en ratas mediante la técnica de la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media. Además se estudiaron las diferencias en cuanto al déficit neurológico y la extensión de la lesión en las líneas de ratas Wistar y SD.

La técnica de la oclusión intraluminal de la ACM por un filamento es aceptada como modelo valioso en las investigaciones relacionadas con el “stroke” experimental, desde su introducción por Koizumi et al, 1986 [7]. Sin embargo, la extensión del área afectada difiere notablemente entre los diferentes grupos de investigación. Esta heterogeneidad se ha atribuido a factores como la línea y edad de los animales, así como las características del filamento (longitud, tipo y diámetro) [15,11]. Más recientemente, la medición del flujo sanguíneo cerebral para controlar

la ubicación correcta del filamento y lograr una oclusión arterial suficiente [10,14], ha conducido a una mayor aceptación y uso de esta técnica.

En la evaluación de la sintomatología clínica de los animales se estableció una escala para la cual se unificaron los criterios utilizados por Walberer, *et al.,* 2006 y Schmid-Elsaesser *et al.,*1998 [13,10], donde la mayor puntuación se le asigna al evento de muerte (tabla 1). En este trabajo el mayor número de animales muertos se registró en el grupo de ratas SD, y cada uno de ellos recibió la mayor puntuación posible. Este pudo haber sido un factor importante que determinó un mayor déficit neurológico en esta línea, aunque es importante señalar que los infartos de gran extensión se asocian a una alta mortalidad [15]. En el grupo de ratas Wistar, también hubo un déficit neurológico importante como expresión de un daño cerebral.

Debido a la baja mortalidad registrada en la línea Wistar, así como el desarrollo de un déficit neurológico y un infarto cerebral importante, se escogió esta línea de rata para futuros estudios de neuroprotectores.

La implementación del modelo de isquemia cerebral focal es de gran importancia como herramienta en las investigaciones relacionadas con la enfermedad cerebrovascular, específicamente con la isquemia y el infarto cerebral. Las guías de conducción de estudios preclínicos para el desarrollo de candidatos neuroprotectores recomiendan con fuerza la inclusión de este tipo de biomodelo en las evaluaciones de los agentes candidatos ([1,5]). Adicionalmente, este modelo por su gran similitud y relevancia con relación al infarto cerebral tromboembólico en humanos es uno de los más usados por los diferentes grupos de investigación.

CONCLUSIONES

Se logró establecer el procedimiento quirúrgico para lograr el modelo de isquemia cerebral focal permanente en ratas.

La línea de ratas Wistar tuvo menor mortalidad y mayor volumen de infarto que la línea Sprague Dawley.

Se seleccionó la línea Wistar para la evaluación de agentes neuroprotectores en el modelo de isquemia cerebral focal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. Stroke. 1999; 30: 2752-2758.

2. Aspey BS, Cohen S, Patel Y, Terruli M, Harrison MJ. Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke. Neuropathol Appl Neurobiol. 1998; 24: 487-497.

3. Bardutzky J, Shen Q, Henninger N, Bouley J, Duong TQ, Fisher M. Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging. Stroke. 2005; 36: 2000-2005.

4. de Jesus LJ, Valhuerdi A, Fernandez O, Llibre JC, Porto R, Lopez AM, Marcheco B, Moreno C. Prevalence of stroke and associated risk factors in older adults in Havana City and Matanzas Provinces, Cuba (10/66 population-based study). MEDICC Rev. 2010; 12: 20-26.

5. Fisher M, Hanley DF, Howard G, Jauch EC, Warach S. Recommendations from the STAIR V meeting on acute stroke trials, technology and outcomes. Stroke. 2007; 38: 245-248.

6. Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Hancock WW, Moskowitz MA, Weiner HL. Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4+ T cells. J Immunol. 2003; 171: 6549-6555.

7. koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke. 1986; 8: 1-8.

8. Peña-Tapia PG, Díaz AH, Torres JL. Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a

través de la arteria carótida interna. Revista de Neurología. 2004; 39: 1011-1016.

9. Sattelmair JR, Kurth T, Buring JE, Lee IM. Physical activity and risk of stroke in women. Stroke. 2010; 41: 1243-1250.

10. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. Stroke. 1998; 29: 2162-2170.

11. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG, III, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. J Neurol Sci. 1997; 153: 8-11.

12. Traystman RJ. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. ILAR Journal. 2003; 44: 85-95.

13. Walberer M, Stolz E, Muller C, Friedrich C, Rottger C, Blaes F, Kaps M, Fisher M, Bachmann G, Gerriets T. Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI). Lab Anim. 2006; 40: 1-8.

14. Woitzik J, Schilling L. Control of completeness and immediate detection of bleeding by a single laser-Doppler flow probe during intravascular

middle cerebral artery occlusion in rats. J Neurosci Methods. 2002; 122: 75-78.

15. Woitzik J, Schneider UC, Thome C, Schroeck H, Schilling L. Comparison of different intravascular thread occlusion models for experimental stroke in rats. J Neurosci Methods. 2006; 151: 224-231.

ANEXOS. Pie de figuras

Tabla 1. Escala de evaluación del estado neurológico

Figura 1. Sistema arterial carotideo en la parte ventral del cuello. A) Se distinguen las arterias: (1) carótida común (ACC), (2) carótida externa (ACE) y (3) carótida interna (ACI). B) La ACC y la ACE se han ligado de forma permanente con sutura de seda 4/0. En la ACI se ha colocado un microclip y una sutura sin ajustar.

Figura 2. Esquema del árbol vascular donde se observa el filamento en la ACI hasta bloquear el origen de la ACM (ACC: arteria carótida común; ACE: arteria carótida externa; ACI: arteria carótida interna; ACM: arteria cerebral media).

Figura 3. Fórmulas empleadas para el cálculo del porciento del volumen de infarto con respecto al lado contralateral (A) y el porciento de edema (B).

Figura 4. A) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. B) Déficit neurológico para las dos líneas de ratas estudiadas.

Figura 5. A) Volumen de infarto corregido por el edema B) Porciento de edema para ambos grupos experimentales.

ANEXOS.

0	No déficit observable
1	Flexión de la pata anterior contralateral
2	Resistencia disminuida a empujón lateral
3	Movimiento circular contralateral inconstante
4	Movimiento circular contralateral constante
5	No actividad espontánea con nivel de conciencia reducido
6	Muerte

Tabla 1. Escala de evaluación del estado neurológico

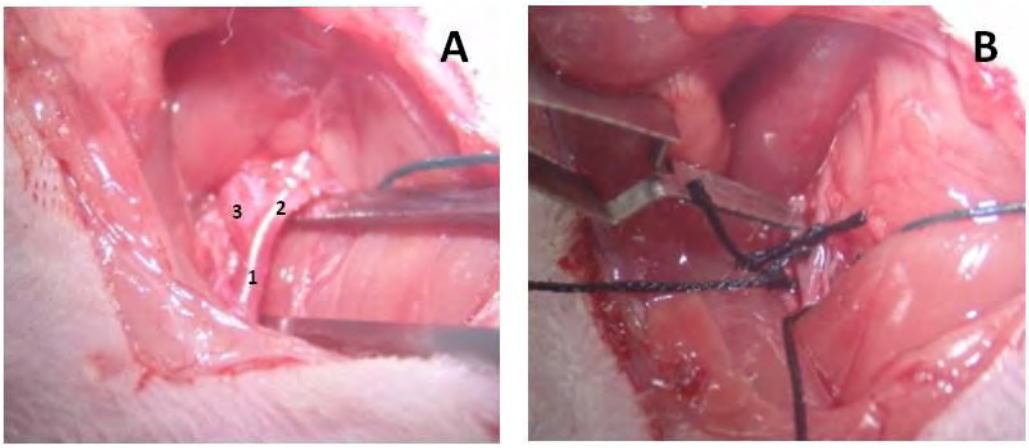

Figura 1. Sistema arterial carotideo en la parte ventral del cuello. A) Se distinguen las arterias: (1) carótida común (ACC), (2) carótida externa (ACE) y (3) carótida interna (ACI). B) La ACC y la ACE se han ligado de forma permanente con sutura de seda 4/0. En la ACI se ha colocado un microclip y una sutura sin ajustar.

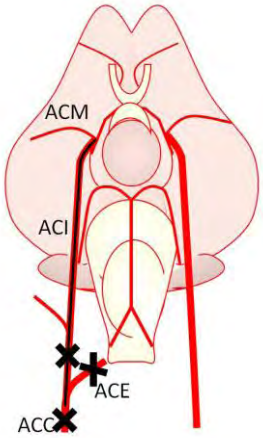

Figura 2. Esquema del árbol vascular donde se observa el filamento en la ACI hasta bloquear el origen de la ACM (ACC: arteria carótida común; ACE: arteria carótida externa; ACI: arteria carótida interna; ACM: arteria cerebral media).

$$\textbf{A)}\quad \text{Volumen lesionado}(\%) = \frac{(\text{V infarto} - (\text{V hemisf ipsi} - \text{V hemisf contra})}{\text{V hemisf contra}} * 100$$

$$\textbf{B)}\quad \text{Edema}(\%) = \frac{(\text{V hemisf ipsi} - \text{V hemisf contra})}{\text{V hemisf contra}} * 100$$

Figura 3. Fórmulas empleadas para el cálculo del porciento del volumen de infarto con respecto al lado contralateral (A) y el porciento de edema (B).

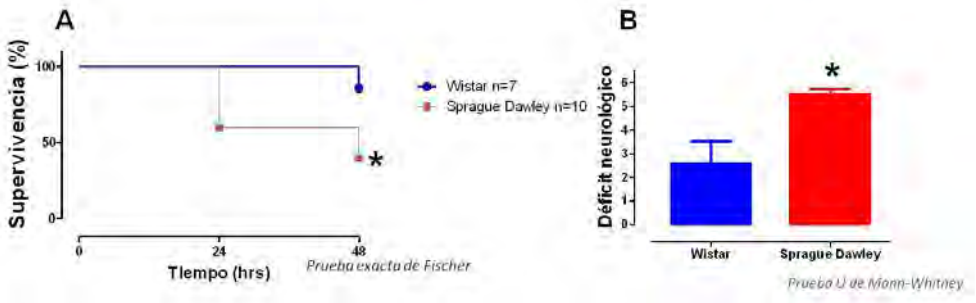

Figura 4. A) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. B) Déficit neurológico para las dos líneas de ratas estudiadas.

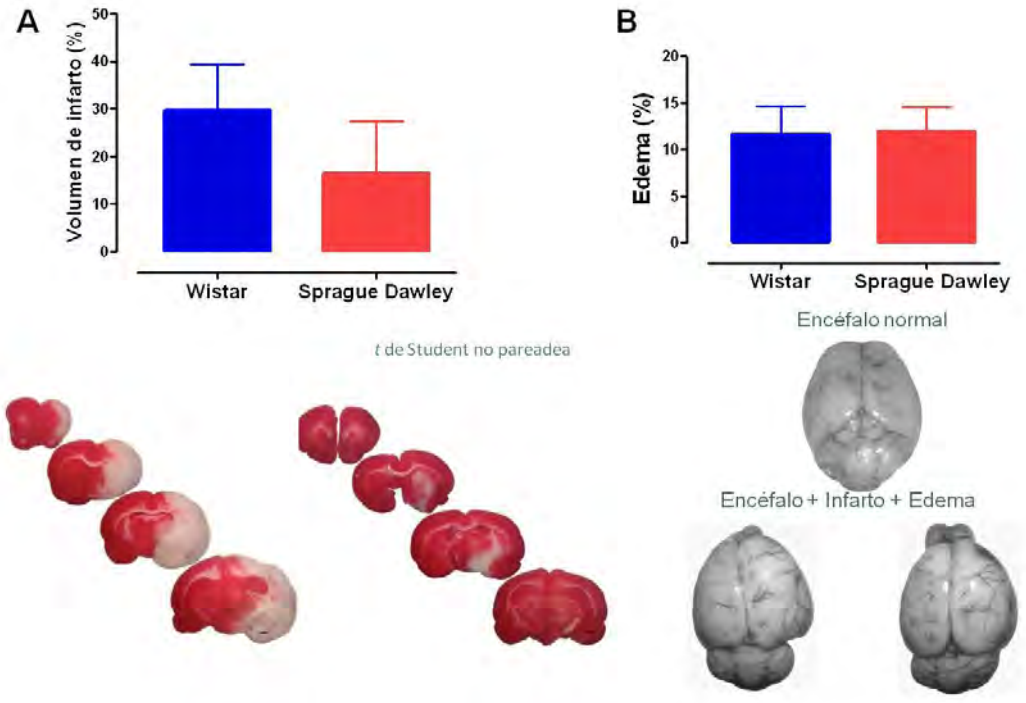

Figura 5. A) Volumen de infarto corregido por el edema B) Porciento de edema para ambos grupos experimentales.