

00322

125



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN LA RATA POR OCLUSIÓN DE LOS CUATRO VASOS (4VO): COMPARACIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA ESTUDIOS DE NEUROPROTECCIÓN”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A:
PEDRO MONTES DEL CARMEN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

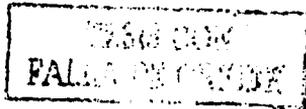
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



...zo a la Dirección General de Bibliotecas de la
...AM a difundir en formato electrónico e impreso el
...ntenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Pedro Montes
del Carmen
FECHA: Febrero 4, 2003
FIRMA: (Firma)

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente



Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata por oclusión de los cuatro vasos
(4VO): Comparación de diferentes alternativas para estudios de neuroprotección"
realizado por Pedro Montes del Carmen.

con número de cuenta 9132585-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis
Propietario

Dra. Gabriela Morali de la Brena.

Gabriela Morali de la Brena

Propietario

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo.

María de Lourdes Massieu Trigo

Propietario

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro.

José Miguel Cervantes Alfaro

Suplente

Dr. Manuel Miranda Anaya.

Manuel Miranda Anaya

Suplente

M. en C. Miguel Angel Palomiro Garibay.

**FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.M.P.**

Consejo Departamental de Biología.

(Firma)
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA**

**ESTA TESIS SE REALIZO EN LA
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN FARMACOLOGIA,
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES;
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.
BAJO LA DIRECCION DE LA
DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA.**

C

Este trabajo lo dedico a:

Mis padres, especialmente a mi madre por apoyarme a superar todos los obstáculos y así lograr finalizar una meta.

A Lucia, Guillermina, Hazel y Pavel por construir un ambiente familiar estable; siempre importante para desarrollarse adecuadamente.

A mis amigos con los que compartí momentos inolvidables durante la carrera: Ivonne, Irma, Itzél, Paty, Erika, Erick, Manuel, Miguel, Blas y Mauricio.

A mis amigos de AFG: Rosa, Leticia, Rosario, Ruth, Fernando, Sergio, Angel y Edgar por complementar, a través de la actividad física y la convivencia, una parte muy importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, por las facilidades otorgadas para la realización de la presente tesis.

Al Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio del CMN Siglo XXI, IMSS, por las facilidades otorgadas para el aprovisionamiento y mantenimiento de los animales de experimentación, así como para la realización de los procedimientos quirúrgicos.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado al proyecto número 31073-M, que permitió la compra de los diversos materiales utilizados, así como el pago correspondiente de la beca de tesis de Licenciatura.

A los Dres. Emilio Castellanos y Sebastián Castillo, Investigadores de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del CMN Siglo XXI, así como al Dr. Ignacio A. González Burgos, Investigador del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS, por el apoyo brindado para el procesamiento histológico de los tejidos.

Especialmente agradezco a la Dra. Gabriela Morali por el apoyo brindado, por su amistad y por mantener siempre constante la disposición y el ánimo en las diferentes etapas de esta tesis.

INDICE

	pag
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
Fisiopatología de la isquemia	3
Alteraciones vasculares	6
Vulnerabilidad selectiva	7
Modelos de isquemia cerebral global en diferentes especies	8
Modelos de isquemia global en ratas por oclusión de los cuatro vasos	9
Agentes neuroprotectores.....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. OBJETIVO GENERAL.....	12
Objetivos específicos	12
5. HIPOTESIS.....	13
6. MATERIAL Y METODOS.....	14
Grupo 1. Modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata.....	14
Grupo 2. Modelo de isquemia cerebral global modificado.....	16
Grupo 3. Modelo de isquemia cerebral modificado y bajo anestesia con halotano.....	18.
Grupo 4. Modelo de isquemia cerebral repetitiva (3x3).....	19
Seguimiento de los animales y obtención de los cerebros para su estudio histológico.....	20
Parámetros evaluados y análisis estadístico.....	20
7. RESULTADOS.....	22
Supervivencia/mortalidad de los animales.....	22
Cumplimiento de los criterios de éxito del modelo.....	25

F

Daño neuronal en el área CA1 del hipocampo.....	28
8. DISCUSION.....	33
9. CONCLUSIONES.....	36
10. APENDICE.....	37
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	39

1. RESUMEN

La isquemia cerebral es una alteración hemodinámica que resulta en una reducción del flujo sanguíneo cerebral y con ello, en la suspensión transitoria del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro. Esta condición da lugar a un conjunto de fenómenos capaces de provocar daño cerebral: alteración de los mecanismos de transporte de iones a través de la membrana ante la falta de energía, liberación masiva de neurotransmisores excitadores, producción de radicales libres, inhibición de síntesis proteica, acidosis intracelular, despolarizaciones espontáneas repetitivas, inflamación, mecanismos de apoptosis y alteraciones en la reparación del ADN. De esta manera, si la isquemia se mantiene por varios minutos, causa daño irreversible a diversos grupos neuronales de regiones cerebrales específicas, cuya magnitud varía de acuerdo a la vulnerabilidad selectiva de estos grupos neuronales, así como a la severidad y duración de la isquemia. Entre las células más vulnerables a la isquemia cerebral se encuentran las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Existe una variedad de modelos de isquemia cerebral global aguda en animales de experimentación. Entre ellos, el modelo de "oclusión de los cuatro vasos" en la rata ofrece varias ventajas. El modelo de oclusión de los cuatro vasos ha sido modificado por diferentes autores a partir de la descripción original, en el intento de obtener resultados de daño cerebral más reproducibles y predecibles, así como de reducir la mortalidad de los individuos. Este modelo se implementó en el laboratorio con diversas variantes a fin de seleccionar el procedimiento más adecuado en función de los requerimientos experimentales. Las variantes fueron: Grupo 1) el modelo tal como se describió originalmente con periodos de 30 minutos de oclusión de las carótidas; Grupo 2) el modelo modificado en el que se limita la circulación colateral hacia el cerebro por compresión de la musculatura cervical, con periodos de oclusión de 13, 20 o 30 minutos; Grupo 3) el mismo modelo con limitación de la circulación colateral, con 13 o 20 minutos de oclusión, pero bajo anestesia con halotano; Grupo 4) el modelo de isquemia breve repetida, de 3 x 3, consistente en tres episodios de 3 minutos a intervalos de una hora. Se utilizaron 162 ratas macho de 400 a 550 g de peso corporal, que se asignaron al azar a cada uno de estos grupos. Se evaluaron y

compararon entre los grupos los porcentajes de supervivencia de los animales, la duración del periodo de inconsciencia post-isquemia y el grado de daño en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. En el grupo 1, 30 minutos de oclusión de las carótidas sin comprimir la musculatura cervical para limitar la circulación colateral al cerebro no provocó una isquemia severa ya que la mayor parte de los animales no perdieron la conciencia durante ni después de la oclusión, ni tuvieron daño neuronal en CA1, resultado que sí se obtuvo en los animales en los que se realizó la compresión muscular (grupo 2). No se encontró una relación directa entre la duración del periodo de oclusión de las carótidas y la duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia o el grado de daño en el hipocampo. En cambio, la duración del periodo de inconsciencia post-isquemia fue un buen indicador del daño cerebral, ya que ratas con periodos de inconsciencia post-isquemia menores a 10 minutos no tuvieron daño en el hipocampo (grado 0) o este fue moderado (grado 1) y ratas con periodos de inconsciencia mayores a 30 minutos tuvieron una alta mortalidad (55 a 75%) y un daño neuronal más severo (grado 2 o 3 en 77% de los sujetos). Trece minutos de oclusión provocaron periodos de inconsciencia post-isquemia de 9 a 38 minutos y daño neuronal moderado pero consistente en todos los animales (grado 1 en el 67% y grado 2 en el 33% de las ratas) en tanto que 20 o 30 minutos de oclusión provocaron periodos de inconsciencia post-isquemia más variables (0 a 120 minutos) y un daño neuronal también más variable (0 a 3). Trece o 20 minutos de oclusión de las carótidas bajo anestesia con halotano (grupo 3) provocaron periodos de inconsciencia post-isquemia y grados de daño en el hipocampo similares a los obtenidos luego de periodos de oclusión de duración similar, sin anestesia (grupo 2), pero provocaron una menor mortalidad de los sujetos (5%). El modelo de isquemia breve repetida (3 x 3) no provocó una isquemia severa, ya que no se encontró daño neuronal significativo en el hipocampo. De los resultados se concluye que el modelo de 13 minutos de oclusión de las carótidas sin anestesia y limitando la circulación colateral al cerebro mediante la compresión de la musculatura cervical es el más adecuado para provocar un daño consistente en el área CA1 del hipocampo, pudiéndose utilizar en estudios de neuroprotección.

2. INTRODUCCION

La isquemia cerebral es una alteración hemodinámica resultante de la reducción de los valores de flujo sanguíneo cerebral por debajo de 10 ml/min/100 g de tejido y con ello la suspensión transitoria del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro. Si ésta es mantenida por varios minutos, causará daño irreversible a diversos grupos neuronales de regiones cerebrales específicas, cuya magnitud variará de acuerdo a la vulnerabilidad selectiva de estos grupos neuronales, a la severidad y a la duración de la isquemia. El mecanismo desencadenado por la isquemia puede ser modificado por la aplicación oportuna de procedimientos físicos o farmacológicos eficaces contra el daño neuronal (Nakano y cols, 1990; Cotrell, 1995; Sicsjo y cols, 1995; Roine, 1997; Sarraf-Yazdi, 1999).

La isquemia cerebral global está asociada con situaciones como el paro cardíaco, en el que todo el órgano cerebral se encuentra en hipoperfusión, o bien situaciones en las que existiendo una isquemia regional amplia, no es posible el flujo sanguíneo colateral hacia los tejidos isquémicos. La isquemia focal, por su parte, se refiere a la oclusión de una arteria distante al círculo de Willis tal como la arteria cerebral media, de modo que en este tipo de isquemia, localizada en un área más restringida, puede existir flujo sanguíneo colateral en la periferia (área de penumbra) y los tejidos cerebrales presentan diferentes grados de hipoperfusión y por lo tanto, de daño neuronal (Sarraf-Yazdi, 1999).

Fisiopatología de la isquemia

El cerebro es un órgano complejo cuya integridad funcional y morfológica no es compatible con un evento isquémico, debido a sus reservas limitadas de glucosa y a su alto requerimiento de este compuesto para el aporte de energía necesaria para mantener sus funciones y su metabolismo (Wagner y Lanier, 1994). Diversas investigaciones han mostrado que numerosos fenómenos críticos determinan el daño cerebral provocado por la isquemia (Figura 1), algunos de los cuales ocurren durante los primeros minutos de isquemia y otros posteriormente, en el transcurso de la reperfusión. Entre los fenómenos inmediatos provocados por la isquemia están la falta de energía, la liberación masiva de

neurotransmisores excitadores y la apertura de canales iónicos que perturban la homeostasis celular. Fenómenos subsecuentes comprenden al edema celular citotóxico, producción de radicales libres, inhibición de síntesis proteica, acidosis intracelular, despolarizaciones espontáneas repetitivas, inflamación, inicio de procesos de apoptosis y alteraciones en la reparación del ADN (Hara y cols, 1993; Siesjo, 1995; Sarraf-Yazdi, 1999).

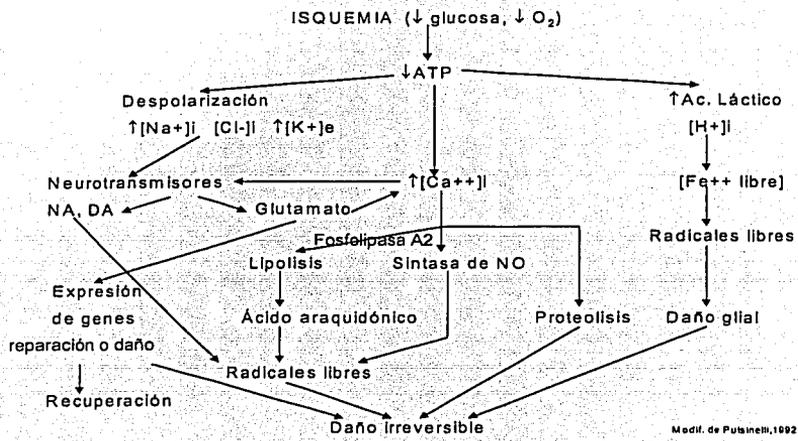


FIGURA 1. Fisiopatología de la isquemia (Modificado de Pulsinelli, 1992.)

El daño neuronal ocurre aún cuando el flujo sanguíneo cerebral y el suministro de energía se hayan restaurado después del episodio de isquemia, de modo que la falta de energía no es la causa inmediata de la muerte celular pero sí es el fenómeno que inicia los mecanismos que conducen al daño neuronal irreversible y que una vez iniciados, continúan su desarrollo hasta culminar con la muerte neuronal (Pulsinelli, 1992).

La magnitud de dichos fenómenos fisiopatológicos depende también de la duración del periodo de isquemia, algunos de los fenómenos de daño se manifiestan de inmediato y dan origen a la muerte neuronal temprana que ocurre en las primeras 5 horas post-isquemia mientras que otros fenómenos se hacen evidentes al cabo de horas o días posteriores a la isquemia y participan en la muerte neuronal por maduración (5 a 24 horas post-isquemia) y muerte neuronal retardada (1 a 7 días post-isquemia). Un periodo de isquemia menos severo o el hecho de que algunos grupos celulares posean una menor vulnerabilidad permite la sobrevivencia neuronal (Pulsinelli y cols, 1982; Susuki y cols, 1985; Kogure y cols, 1988; Murakami y cols, 1997).

Las consecuencias iniciales de la falta de energía son las alteraciones de la actividad de diversos mecanismos intercambiadores de iones a través de la membrana, dependientes de energía, que normalmente mantienen los gradientes de sodio, potasio y calcio intra y extracelulares y con ello el potencial de membrana en las neuronas; su alteración provoca un desbalance iónico y la despolarización membranal (despolarización anóxica) (Hansen y Lundbaek, 1989; Wagner y Lanier, 1994; Hara y cols, 1993). El gradiente de sodio a través de la membrana, por ejemplo, es necesario para el transporte de otros iones mediante la actividad de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ de modo que durante la isquemia ingresan sodio y calcio en forma masiva al interior de la célula, a través de canales dependientes de voltaje. El ingreso masivo de sodio atrae al cloro al interior de la neurona con lo que aumenta la osmolaridad y se origina la entrada de agua (edema celular) y eventualmente la ruptura de la membrana celular (Mitani y cols, 1994). La despolarización anóxica también provoca la liberación de neurotransmisores incluyendo a los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato por un mecanismo dependiente de calcio o a través del funcionamiento inverso de sus transportadores (Hansen y Lundbaek, 1989; Haddad y Jiang, 1993; Mitani y cols, 1994). Estos neurotransmisores actúan sobre receptores específicos de alta afinidad como los receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA/kainato (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), así como con los receptores metabotrópicos (mGluR). La interacción de los aminoácidos excitadores con los receptores

NMDA provoca el ingreso de calcio, en tanto que la interacción con los receptores AMPA resulta en un ingreso masivo de sodio, a través de canales iónicos asociados a estos receptores.

El calcio intracelular también se incrementa por su liberación a partir de las pozas intracelulares (Choi, 1987). El incremento de calcio intracelular puede desencadenar varios fenómenos de daño al activar diversas enzimas: fosfolipasas A2 que hidrolizan a los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular incrementando la cantidad de ácidos grasos libres como el ácido araquidónico, proteasas que destruyen proteínas estructurales y funcionales, la sintasa del óxido nítrico con lo que se inician algunos mecanismos de daño por radicales libres de oxígeno al ocurrir la reperfusión y nucleasas que dañan las cadenas de los ácidos nucleicos, fenómenos que en su mayoría determinan la muerte celular por necrosis (Siesjo, 1995; Sarraf-Yazdi, 1999). Adicionalmente, se induce la expresión de genes específicos que dan lugar a la síntesis de proteínas que pueden actuar como factores de transcripción para la síntesis de RNA's y proteínas aparentemente relacionadas con procesos de reparación o bien con fenómenos de muerte neuronal tardía o de apoptosis (Sarraf-Yazdi, 1999).

Alteraciones vasculares

Al concluir el periodo de isquemia se presentan alteraciones vasculares que originan cambios en el flujo sanguíneo cerebral. La hipcremia es una fase breve de aumento del flujo sanguíneo que se presenta al eliminarse el bloqueo vascular. Esta es seguida por un largo periodo de hipoperfusión post-isquemia y un fenómeno de no reflujo que pueden ocurrir aún cuando se hayan restaurado las condiciones adecuadas para la reperfusión y oxigenación cerebral. La hipoperfusión resulta de una depresión metabólica cerebral que ocurre después de la isquemia y que se acompaña de falta de reactividad vascular para llevar al cabo los ajustes vasomotores compensatorios, así como de una obstrucción microvascular. El fenómeno de no reflujo se refiere a la reperfusión incompleta del tejido cerebral al terminar el periodo de isquemia. Este fenómeno se debe a varios factores: aumento de la viscosidad de la sangre, compresión microcirculatoria por el edema perivascular de las células gliales,

formación de microvellosidades endoteliales, incremento de la presión intracraneal, hipotensión arterial post-isquemia y coagulopatía vascular diseminada. El fenómeno de no reflujo incrementa su duración al prolongarse el periodo de isquemia (Hossman, 1990; Davies y Hagen, 1993).

Vulnerabilidad selectiva

No todas las áreas cerebrales y todos los tipos celulares son igualmente dañados por la isquemia. Entre las neuronas más vulnerables a la isquemia cerebral se encuentran las neuronas piramidales del Cuerno de Ammon del hipocampo (CA), en particular las regiones CA1 y CA4, las neuronas espinosas medianas de la porción dorso lateral del cuerpo estriado, las neuronas de la pars reticulata de la substancia negra, las neuronas de las capas III y V de la corteza prefrontal cerebral y las células de Purkinje del cerebelo.

Se ha propuesto que la vulnerabilidad selectiva está relacionada con la abundante innervación excitadora que reciben estas neuronas. En las áreas vulnerables se ha descrito la presencia de una mayor cantidad de receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato), a AMPA/kainato y a quisqualato respecto a las áreas de menor vulnerabilidad (Wieloch, 1985). De este modo el daño provocado por la isquemia resulta de la excitotoxicidad causada por la liberación presináptica masiva de neurotransmisores excitadores (glutamato y aspartato) o de la liberación glial a través de los transportadores de aminoácidos excitadores, que despolarizan intensamente a estas neuronas causando un severo desbalance entre las entradas excitadoras e inhibitorias a las neuronas. La duración del periodo de isquemia influye también en la vulnerabilidad de las estructuras cerebrales, por ejemplo algunas estructuras que no se dañan con un periodo de 5 minutos de isquemia, sí presentan un daño cuando la duración del periodo de isquemia se incrementa (Wieloch, 1985; Kogure y cols, 1988).

Modelos de isquemia cerebral global en diferentes especies

Se ha desarrollado una diversidad de modelos experimentales de isquemia cerebral global aguda en la búsqueda de aquél que reproduzca de manera más adecuada las condiciones que se presentan espontáneamente cuando un individuo sufre una isquemia global por paro cardíaco, por arritmias o por una hipotensión severa, de modo que permita estudiar la fisiopatología de esta condición y las alternativas de reducir el daño. Por otra parte, se busca que el modelo sea altamente reproducible, accesible metodológicamente, económico y que permita realizar diversas evaluaciones funcionales y morfológicas del daño como para permitir una evaluación precisa de su magnitud así como de la posible acción neuroprotectora de un procedimiento terapéutico o de un fármaco.

Se han desarrollado modelos de isquemia cerebral global en algunas especies de primates, mediante la aplicación de tomiquetes pediátricos colocados alrededor del cuello en los que se aplica una presión de 1,500 torr (1,500 mm Hg) para provocar isquemia por compresión de las principales arterias que llevan flujo sanguíneo al cerebro (Bleyaert y cols, 1978; Gisvold y cols, 1984). Este tipo de modelo experimental ha sido poco utilizado por motivos éticos y económicos.

Se han utilizado modelos de paro cardíaco por compresión de los principales vasos de acceso al corazón en ratas (Ito y cols, 1975), así como paro cardiorrespiratorio por fibrilación ventricular en gatos (Todd, 1982; Cervantes y cols, 1989). Sin embargo, estos procedimientos requieren una instrumentación precisa durante la realización de los experimentos, consistente en la aplicación de ventilación mecánica controlada y en el registro continuo de la presión arterial y del EEG para la validación del paro cardíaco y de su recuperación, así como el registro periódico de los gases (O_2 y CO_2) en sangre para la corrección oportuna de la acidosis luego de los procedimientos de reanimación. Esta instrumentación no es siempre accesible y además requiere de la participación de más de tres personas en el momento del experimento. Por otra parte, los estudios en gatos y en perros, además de que son más costosos que los estudios en roedores y de avance más lento por la imposibilidad de

trabajar simultáneamente con grupos de varios animales, se han visto limitados recientemente por las normas éticas de utilización de animales de laboratorio.

Entre los modelos de isquemia global en roedores, el de uso más común en las pasadas décadas ha sido el de la ligadura de las arterias carótidas en el gerbo por uno o varios periodos de 3 a 5 minutos (Kirino, 1982; Kirino y cols., 1985; Shuaib y cols, 1992). La exposición de los gerbos a episodios repetidos de isquemia a intervalos de una hora incrementa el daño neuronal en comparación con el provocado por un episodio único (Kato y cols, 1989; Tomida y cols, 1987). Este roedor, en un porcentaje importante de los individuos, no presenta comunicación arterial entre ambos hemisferios cerebrales al carecer del polígono de Willis por ausencia de las arterias comunicantes posteriores. De este modo, se le utilizó inicialmente con la intención de provocar isquemia global en un hemisferio dejando al otro hemisferio como testigo. Sin embargo, dado que esta falta de circulación interhemisférica sólo se presenta en un 60 a 70% de los individuos, se dejó de utilizar este modelo para provocar isquemia hemisférica. Por otra parte, dada la limitada posibilidad de realizar pruebas funcionales y conductuales en esta especie en comparación con la rata y dada la frecuencia con la que se presentan crisis convulsivas, que inducen a su vez un daño neuronal adicional al provocado por la isquemia. Por estas razones, el empleo del gerbo como modelo de isquemia cerebral global se ha visto reducido en los años recientes (Hunter y cols, 1998).

Modelos de isquemia global en ratas por oclusión de los cuatro vasos

El modelo de isquemia cerebral global en roedores que parece ofrecer las mayores ventajas en cuanto a su manejo, a la accesibilidad del procedimiento quirúrgico y a la posibilidad de experimentar simultáneamente con varios animales, además de ofrecer la posibilidad de realizar una serie de evaluaciones funcionales en los individuos, es el llamado "modelo de oclusión de los cuatro vasos" en ratas. Éste tiene adicionalmente la ventaja de que, cuando se provoca el episodio de isquemia en el

animal sin anestesia, permite verificar en forma directa, no invasiva, a través de la pérdida de la conciencia, la severidad de la isquemia (Pulsinelli y cols, 1979; 1982; Capdeville y cols, 1984).

Sin embargo, este modelo, en los diferentes laboratorios que describen su empleo para estudios de neuroprotección, ha sido modificado (Kameyama y cols, 1985; Pulsinelli y Buchan, 1988; Sugio y cols, 1988; Nakano y cols, 1989; Schmidt-Kastner y cols, 1997; Herguido y cols, 1999) para permitir su realización dentro de las condiciones más adecuadas que den como resultado efectos consistentes y reproducibles buscando además el menor porcentaje de mortalidad posible de los sujetos.

Por ejemplo, el grupo de Pulsinelli, luego de describir resultados exitosos con su modelo original (Pulsinelli y cols, 1979), propuso una modificación consistente en la compresión de la musculatura paravertebral y cervical durante el periodo de oclusión de las carótidas (Pulsinelli y Buchan, 1988) con la finalidad de limitar el flujo sanguíneo al cerebro a través de circulación colateral localizada entre esos músculos y lograr una isquemia más severa. Algunos autores sugieren el empleo de anestesia durante el episodio de isquemia para reducir la incidencia subsecuente de crisis convulsivas generalizadas (Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Schmidt-Kastner y cols, 1997) y para contrarrestar el aumento de la presión arterial que ocurre ante la oclusión de las carótidas y que permite un aporte suficiente de flujo sanguíneo al cerebro a través de la circulación colateral, impidiendo el daño neuronal. Otros grupos de investigación utilizan un modelo de oclusión de dos vasos (carótidas) o de cuatro (vertebrales y carótidas) en condiciones de hipotensión por el retiramiento de un volumen de sangre durante el periodo de oclusión de las carótidas y su restitución posterior (Beck y cols, 1993; Mcbean y Kelly, 1998). Otros autores exponen los animales a episodios cortos, no letales de isquemia repetida por tres o más veces a intervalos de una hora (Nakano y cols, 1989), en un modelo similar al que se utiliza en gerbos (Kato y cols, 1989).

Estos modelos, además de proporcionar información precisa acerca de la fisiopatología de la isquemia, permiten definir condiciones controladas del episodio de isquemia cerebral que provoquen

un daño predecible que se pueda utilizar como punto de comparación para la evaluación de agentes neuroprotectores.

Agentes neuroprotectores

Existen condiciones que permiten tolerar, dentro de ciertos límites, las condiciones impuestas por la falta de oxígeno y glucosa en el cerebro. Así, se ha demostrado que la hipotermia reduce el daño provocado por la isquemia (Busto y cols, 1987; Clifton y cols, 1989; Moller y cols, 1989; Minamisawa y cols, 1990). La protección ejercida por 4-8°C de hipotermia en modelos de isquemia es substancialmente mayor y más consistente que la protección atribuible a agentes farmacológicos (Clifton y cols, 1989). Por lo tanto, para que los modelos de isquemia en gerbos y en ratas puedan ser empleados en la evaluación de fármacos, la temperatura cerebral y corporal necesita ser registrada y mantenida cuidadosamente dentro de valores normales, especialmente durante el periodo de isquemia (Busto y cols, 1987; 1989). Una reducción de la temperatura corporal a 35 °C o menos, durante y en las primeras horas posteriores a un episodio de isquemia, reduce significativamente el daño a las neuronas piramidales del hipocampo.

La administración previa o inmediata (dentro de los primeros 60 minutos a partir del episodio de isquemia-anoxia) de fármacos que disminuyan o contrarresten uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos dependientes de la duración de la isquemia-anoxia puede reducir el daño neuronal. Con este objetivo se han utilizado agentes anestésicos generales que reducen la tasa metabólica y el consumo de oxígeno, bloqueadores de los canales de calcio, anticonvulsivos, fármacos que reducen la liberación de neurotransmisores excitadores, antagonistas de los receptores de glutamato, agonistas del receptor GABA_A, incluyendo esteroides sintéticos y naturales, así como antagonistas de receptores de opioides y agentes antioxidantes. (Hallmayer y cols, 1985; Shapiro, 1985; Cervantes y cols, 1989; 1995; Johansen y Diemer, 1991; Kenneth, 1994; Shuaib y cols, 1995; Cotrell, 1995; Jiang y cols, 1996; González-Vidal y cols, 1998; Letechipa-Vallejo y cols, 2001; Cervantes y cols, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la literatura se han descrito diversas variantes del "modelo de oclusión de los cuatro vasos" para inducir isquemia cerebral global aguda en la rata. Sin embargo, no existe un acuerdo en las consecuencias que dichas variantes pueden tener en la magnitud del daño observado en la población neuronal de estructuras cerebrales específicas y en diversos aspectos funcionales del sistema nervioso. Por ello, es de la mayor importancia para la línea de investigación de nuestro laboratorio, referente al estudio de compuestos neuroprotectores, establecer de la manera más precisa las consecuencias de las variantes del modelo de oclusión de los cuatro vasos, en la población neuronal de las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia.

4. OBJETIVO GENERAL

Comparar la efectividad de diversas variantes del modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos en la rata, que permitan la sobrevivencia de los sujetos a largo plazo y que provoquen daño severo de la capa de neuronas piramidales del cuerno de Ammon (CA) del hipocampo.

Objetivos específicos

Comparar el efecto de cuatro variantes del modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos en la rata, sobre la sobrevivencia de los sujetos, sobre el cumplimiento de los criterios de severidad de la isquemia (pérdida de la conciencia durante el episodio de isquemia y duración del periodo de inconsciencia post-isquemia), así como sobre la sobrevivencia de la población de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo dorsal de la rata.

5. HIPOTESIS

Las cuatro variantes utilizadas del modelo de oclusión de los cuatro vasos (4VO) en ratas, darán diferente resultado en cuanto a la sobrevivencia de los animales, al cumplimiento de los criterios de severidad de la isquemia y al grado de pérdida o daño de neuronas piramidales en el hipocampo.

1) Dada la información acerca del aporte de flujo sanguíneo colateral al cerebro, el modelo que incluye la restricción de la circulación colateral que se localiza en la musculatura cervical y paravertebral, durante el episodio de isquemia por 4VO en las ratas, permitirá obtener una mayor severidad del daño, en comparación con el modelo en el que no se limita esta circulación, que se manifestará por periodos más largos de inconsciencia post-isquemia y por una mayor despoblación del cuerno de Ammón del hipocampo.

2) El efecto sobre estos indicadores tendrá relación con la duración del episodio de isquemia.

3) La anestesia con halotano durante el episodio de isquemia facilitará el manejo de los animales, reduciendo su mortalidad y por sus efectos hipotensores permitirá la reducción del flujo sanguíneo cerebral durante la oclusión de las carótidas, dando como resultado periodos más largos de inconsciencia post-isquemia y una mayor despoblación del cuerno de Ammón del hipocampo.

4) El modelo de isquemia breve (3 min) repetida (3 veces, a intervalos de una hora) provocará menor mortalidad, pero una severidad del daño similar a la provocada por un solo periodo prolongado de isquemia en los otros modelos.

6. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron un total de 162 ratas macho Sprague-Dawley de 400 a 550 g de peso corporal, que fueron mantenidas en un cuarto del Bioterio Central del CMN Siglo XXI del IMSS, con temperatura y ciclos de luz-obscuridad controlados (20 a 22°C, 12 h luz:12 h obscuridad, con luz de las 06:00 a las 18:00 h) y que fueron colocadas antes de las cirugías, en cajas colectivas con 4 o 5 ratas por caja y luego de las cirugías en cajas individuales, con acceso libre al agua y alimento (Purina). Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se llevaron al cabo en los quirófanos del Bioterio Central.

Grupo 1. Modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata por oclusión de los cuatro vasos (4V-O).

Se utilizaron 19 ratas (450 -550 g) en las que se realizaron los procedimientos quirúrgicos correspondientes a este modelo, de acuerdo con la descripción de Pulsinelli y cols (1979). Cada rata fue anestesiada con clorhidrato de xilazina (10mg/Kg im, Rompun, Bayer de México) y clorhidrato de ketamina (90mg/Kg im, Temikal, Helber de México). Habiendo rasurado y desinfectado la piel de la nuca y del cuello, se realizó una incisión en la piel de la nuca por detrás del hueso occipital y se separaron de la línea media los músculos paraespinales hasta lograr el acceso al músculo triangular que se inserta en su base, en el hueso occipital y que se extiende caudalmente cubriendo las primeras vértebras cervicales, de modo que su ápice se inserta en la apófisis espinosa de la cuarta vértebra cervical. Bajo el microscopio de cirugía se practicó una incisión por disección roma en cada extremo de la base de este músculo hasta lograr el acceso a las apófisis transversas de la primera vértebra cervical (Atlas). Se localizó a uno y otro lado en ellas, la arteria vertebral en su punto de emergencia a través del foramen alar y se cauterizó con un electrocauterio manual (Aaron, Medical Industries, Inc. EEUU), con lo que quedó ocluida permanentemente. Se suturó la herida. Se hizo otra incisión en la

región ventral del cuello y se disecaron el tejido adiposo y las glándulas submaxilares para localizar a los músculos esternohioides que cubren a la tráquea, separando entre éstos y los esternomastoideos para acceder a las arterias carótidas comunes; éstas se aislaron del nervio vago que corre paralelamente, en un espacio de aproximadamente 6 mm, de modo de evitar su estimulación al manipular la arteria en los procedimientos posteriores, lo que provocaría un paro respiratorio. Se verificó que la arteria aislada fuera la carótida común y no una ramificación de ésta (carótida interna o externa) y se insertó por debajo de cada carótida común una porción de 4 cm de hilo de seda calibre tres ceros (000) como referencia; ésta permitió un fácil acceso a las arterias carótidas comunes durante la segunda cirugía, dos días después. Se suturó la herida y se permitió la recuperación total del animal. Se le administraron 10 ml de solución salina subcutánea para prevenir deshidratación y 120,000 UI de penicilina benzatínica para prevenir infecciones.

A las 48 horas, se anestesió ligeramente cada rata con éter, previa administración intraperitoneal de atropina (0.1 mg en 0.1ml, Atropisa, Lab. PISA México) 10 minutos antes, para evitar la formación de secreciones en las vías respiratorias por la inhalación del éter, que comprometerían la respiración de la rata. Para anestesiarla se introdujo en una cámara de anestesia consistente en un recipiente de plástico transparente en el cual se colocaron torundas de algodón envueltas en una gasa sobre las que se vertió el éter; se dejó vaporizar unos segundos y se introdujo a la rata. En cuanto la rata dejó de ofrecer resistencia se sacó de la cámara y fuera de ella se mantuvo la anestesia utilizando un vial pequeño con una torunda de algodón con éter, el cual se mantuvo cerca de las narinas de la rata para que inhalase el anestésico y se mantuviera inconsciente. Se retiraron los puntos de sutura realizados en la primera cirugía para abrir la incisión ventral del cuello, se disecó el tejido conjuntivo que se hubiera formado y se localizaron y aislaron los hilos de cada referencia previamente insertada bajo las carótidas comunes; esto permitió el acceso a ambas carótidas y su liberación del tejido adyacente para dejar libre el espacio en el cual se encontraban separadas del nervio vago. Se retiró el éter para permitir que la rata recuperara parcialmente la conciencia, o sea, que presentara reflejo corneal y movimiento de las

vibras pero sin movimientos corporales vigorosos ni enderezamiento. Bajo estas condiciones se ocluyeron ambas carótidas mediante la colocación de clips quirúrgicos que obstruyeron el flujo sanguíneo, lo cual se verificó bajo el microscopio de cirugía. Es un requisito del modelo experimental, que la rata no esté bajo anestesia al momento de ocluir las carótidas para que la pérdida de la conciencia sea un indicador de la falta de aporte sanguíneo al cerebro. Se mantuvo la oclusión de las carótidas durante 30 minutos y sólo se consideró exitoso el episodio de isquemia si la rata perdió el estado de conciencia durante todo el periodo de oclusión y no mostró movimientos voluntarios. Habiendo concluido los 30 minutos de isquemia, se retiraron los clips quirúrgicos de las arterias carótidas para permitir el reinicio del flujo sanguíneo hacia el cerebro. Se registró el tiempo en el que la rata recuperó la conciencia tomando como criterio para ello, el reflejo de enderezamiento. Se le anestesió ligeramente con éter para suturar la herida y se permitió la recuperación de la rata, vigilando este proceso durante por lo menos 2 horas para registrar cualquier anomalía como la presentación de posibles crisis convulsivas, movimientos anormales, alteraciones del tono muscular, paros respiratorios, etc.

Grupo 2. Modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata por oclusión de los cuatro vasos (4V-O) modificado para limitar la circulación colateral al cerebro

Se utilizaron 104 ratas (400-500 g.) que fueron sometidas a los mismos procedimientos descritos para el grupo anterior en cuanto a la anestesia, la cauterización de las arterias vertebrales y la referencia de las arterias carótidas comunes durante la primera cirugía. Además de estos procedimientos, se hizo una modificación que consistió en introducir un hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre 0) a través de la incisión ventral del cuello, inmediatamente después de haber referido las arterias carótidas comunes, el cual se hizo pasar por detrás de la tráquea, esófago, arterias carótidas comunes y nervios vagos, pero anterior a los músculos cervicales y paravertebrales. Los cabos del hilo se pasaron por debajo de la piel hasta la nuca de modo de salir por un punto de la incisión dorsal,

cuidando que las venas yugulares quedaran adheridas a la piel, en una posición superficial con respecto al paso del hilo. Los cabos externos del hilo se ataron entre sí para evitar que se retrajeran. Se suturó la piel. Se administraron 10 ml de solución salina subcutánea para prevenir deshidratación y 120,000 UI de penicilina benzatínica para prevenir infecciones.

Dos días después, al igual que en el grupo anterior, se anestesió a la rata con éter previa administración intraperitoneal de 0.1 mg de atropina y se irrigó clorhidrato de lidocaína al 1% (Xilocaina, 500 mg/50 ml, Astra, México) en la incisión cervical en donde se hallaban los cabos anudados del hilo de seda calibre cero, para anestesiarse localmente y evitar dolor al retraerlo. Los siguientes procedimientos experimentales se realizaron manteniendo la temperatura corporal de los sujetos dentro de valores normales (35.5 a 37.5 °C). Para ello, se colocó la rata sobre un cojín eléctrico que le transmitió calor en forma constante, se midió la temperatura rectal con un termómetro digital y se mantuvo la temperatura en los valores mencionados ajustando la transmisión de calor por el cojín eléctrico o suplementando con una lámpara de 60 Watts colocada cerca de la rata para impedir que la temperatura bajara. Bajo estas condiciones se ocluyeron las arterias carótidas comunes aplicando los clips quirúrgicos y se retrajeron los cabos del hilo de seda en la nuca para comprimir los músculos cervicales y paravertebrales y evitar el flujo sanguíneo colateral a través de la red vascular que se encuentra entre esos músculos. La fuerza que se aplicó durante la tracción de este hilo sólo debió ser suficiente para lograr que la rata mantuviera el estado de inconsciencia pero sin provocarle problemas respiratorios derivados de una posible estimulación de la tráquea. Para comparar el efecto de episodios de isquemia de diferente duración, en este grupo se incluyeron ratas que fueron sometidas a periodos de 30, de 20 y de 13 minutos. Se verificó que durante el periodo isquémico se cumpliera con el requisito de inconsciencia al no observarse movimientos corporales de resistencia o movimientos de las vibras. Finalizando el periodo de isquemia, se retiraron los clips quirúrgicos de las arterias carótidas comunes y se dejó de comprimir los músculos cervicales y paravertebrales; de esta manera se restituyó el flujo sanguíneo hacia el cerebro de la rata. Al concluir el periodo isquémico, la rata fue

mantenida sobre el cojín eléctrico hasta que recuperara la conciencia tomando como criterio para ello, el reflejo de enderezamiento: Se le anestesió ligeramente con éter para suturar la herida y se colocó en su jaula para que se recuperara totalmente, vigilando este proceso durante por lo menos 2 horas para registrar la presentación de posibles crisis convulsivas, movimientos anormales, alteraciones del tono muscular, paros respiratorios, etc.

Grupo 3. Modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata por oclusión de los cuatro vasos (4V-O) modificado y bajo anestesia con halotano.

Se emplearon 20 ratas macho (400-500g) que fueron sometidas a procedimientos similares a los de los grupos anteriores: anestesia, cauterización de las arterias vertebrales, referencia de las arterias carótidas comunes y colocación del hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre 0) alrededor de los músculos de la región cervical.

La segunda fase del procedimiento, en la cual se ocluyeron las carótidas para ocasionar el episodio de isquemia, se realizó también bajo control de la temperatura corporal de los sujetos, pero bajo anestesia con halotano. La fase inicial de la anestesia se realizó colocando a la rata dentro de una cámara de inducción de acrílico, de 12 x 12 x 22 cm en la que se hizo pasar una corriente de halotano al 1.5 o 2.5% en O₂ durante 2 a 3 min. Una vez anestesiada, se colocó sobre un cojín eléctrico (en posición decúbito dorsal) que le transmitió calor en forma constante y se mantuvo la anestesia con halotano al 1 - 1.5% en O₂ a través de una mascarilla. Se registró la temperatura rectal con un termómetro digital y sólo hasta que la temperatura osciló entre 35.5°C y 37.5°C se procedió a colocar los clips quirúrgicos que ocluyen el flujo sanguíneo de las arterias carótidas durante 13 (n=4) o 20 (n=15) minutos. Se mantuvo la temperatura rectal en el rango mencionado durante el periodo de isquemia. Un minuto antes de concluir este periodo se retiró la anestesia, la rata fue mantenida sobre el cojín eléctrico hasta que recuperara el reflejo de enderezamiento, se le suturó la herida y se colocó en su jaula para que se recuperara totalmente, vigilando este proceso durante por lo menos 2 horas para

registrar la presentación de posibles crisis convulsivas, movimientos anormales, alteraciones del tono muscular, paros respiratorios, etc.

Grupo 4. Modelo de isquemia cerebral global aguda repetitiva en la rata por oclusión de los cuatro vasos (4V-O): Modelo de 3 x 3.

Se emplearon 19 ratas macho (400-500g) que fueron sometidas a procedimientos similares a los del grupo anterior: anestesia, cauterización de las arterias vertebrales, referencia de las arterias carótidas comunes, colocación del hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre 0) alrededor de los músculos de la región cervical y control de la temperatura entre 35.5°C y 37.5°C durante la oclusión.

Este grupo, al que en forma similar a los grupos anteriores se le cauterizaron permanentemente las arterias vertebrales, fue sometido a 3 periodos de isquemia por oclusión transitoria de las carótidas comunes y compresión de la musculatura paravertebral con duración de 3 minutos a intervalos de una hora (3 X 3 min, 1 h), de acuerdo con la descripción de Nakano y cols, 1989).

Habiendo anestesiado con éter a la rata, se colocó sobre un cojín eléctrico que le transmitió calor en forma constante, se midió la temperatura rectal con un termómetro digital y sólo hasta que la temperatura osciló entre 35.5°C y 37.5°C se procedió a colocar los clips quirúrgicos para ocluir el flujo sanguíneo de las arterias carótidas. Durante cada periodo isquémico (3 minutos) se midió la temperatura rectal y se mantuvo en el rango mencionado ajustando la transmisión de calor por el cojín eléctrico o suplementando con una lámpara de 60 Watts. Al concluir el primer periodo de isquemia, la rata fue mantenida sobre el cojín eléctrico hasta que recuperara el reflejo de enderezamiento, se colocó en su jaula para que se recuperara totalmente y en ésta se continuó el registro y control de la temperatura rectal a fin de mantenerla en el rango mencionado mediante el acercamiento de una lámpara eléctrica.

Una hora después de haber iniciado el primer periodo de isquemia y luego de anestesiarse nuevamente con éter a los animales, se procedió de igual manera a realizar un segundo periodo de

oclusión de las carótidas y una hora más tarde, un tercer periodo. Al concluir cada uno de estos periodos, la rata fue igualmente mantenida sobre el cojín eléctrico hasta que recuperara el reflejo de enderezamiento y se colocó en su jaula para que se recuperara totalmente.

Seguimiento de los animales y obtención de los cerebros para su estudio histológico

En todos los grupos, las ratas se mantuvieron en sus jaulas por 30 días después de la oclusión de los cuatro vasos y se registró su recuperación o, en su caso, la incidencia de muertes, tratando de identificar si la muerte tuvo relación con la severidad de la isquemia (periodos prolongados de inconsciencia, crisis convulsivas, etc.) o con alguna causa diferente (hemorragia, infección de vías respiratorias, etc.). Pasado este periodo, las ratas sobrevivientes fueron anestesiadas con tiopental sódico por vía intraperitoneal (0.5 a 1.0 g; Sodipental, Lab. PISA, México) y se les perfundió por vía cardíaca con solución salina (200 ml) seguida por formol al 10% en buffer de fosfatos (350 ml) para fijar el cerebro y realizar el procesamiento histológico. El mismo día o al día siguiente se extrajo el cerebro y se continuó su fijación por inmersión en el mismo tipo de fijador. Luego de por lo menos tres días, se cortaron rebanadas de aproximadamente 3 mm correspondientes al hipocampo, entre las coordenadas Bregma -2.30 a Bregma -4.52 de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1986). Se deshidrataron e incluyeron en parafina, se cortaron con un microtomo obteniendo cortes de 10 micras que se tiñeron con violeta de cresilo. Mediante esta técnica histológica (Apéndice A) se obtuvieron laminillas con los cortes tisulares para su análisis en el microscopio.

Parámetros evaluados y análisis estadístico

Se evaluaron los siguientes parámetros: la proporción de sujetos que murieron durante o después del episodio de isquemia por severidad de la misma; la proporción de sujetos que cumplieron los criterios de pérdida de la conciencia durante el episodio de isquemia (que no presentaron movimientos corporales indicativos de alertamiento); la duración del periodo de inconsciencia post-isquemia (el

tiempo que tardó cada rata en recuperar la reacción de enderezamiento); y el grado de daño neuronal en el campo CA1 del hipocampo dorsal considerando cuatro categorías de daño: 0 = ninguna neurona dañada; 1 = menos del 20% de neuronas dañadas (encogidas, poligonales, o con contenido obscuro; 2 = de 20 a 50% de neuronas dañadas; 3 = más del 50% de neuronas dañadas o despoblación neuronal y proliferación glial.

La proporción de sujetos que murieron durante o después del episodio de isquemia por severidad de la misma, así como la proporción de sujetos que cumplieron los criterios de pérdida de la conciencia durante el episodio de isquemia se compararon entre los diferentes grupos mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Fisher. La duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia se comparó entre los grupos mediante pruebas *U* de Mann-Whitney. Se evaluó el grado de daño neuronal en el área CA1 del hipocampo en los sujetos de cada grupo experimental y este grado de daño se comparó entre los grupos mediante pruebas *U* de Mann-Whitney.

7. RESULTADOS

Las variantes del modelo de isquemia cerebral global aguda por "oclusión de los cuatro vasos" tuvieron diferentes resultados en cuanto a la supervivencia de los animales, al cumplimiento de los criterios de éxito del modelo por pérdida de la conciencia durante y post-isquemia, a la duración del periodo de inconsciencia post-isquemia, así como a la despoblación o daño de la capa de neuronas piramidales del hipocampo.

Supervivencia/mortalidad de los animales

Mortalidad no asociada al episodio de isquemia

De las 162 ratas utilizadas en los diferentes grupos experimentales, 42 (25.9% del total) murieron durante o después de la cauterización de las arterias vertebrales y referencia de las carótidas, pero antes de la oclusión de las carótidas, por causas no relacionadas con la isquemia, tales como manipulación quirúrgica (anestesia, hemorragia durante la cauterización de las arterias vertebrales, estimulación del nervio vago durante la disección de las carótidas) o post-quirúrgica inadecuadas (deshidratación, exposición a frío), o bien por desarrollo y manifestación o agravamiento de infecciones respiratorias, en particular en aquellos sujetos que no recibieron medicación preventiva o que estuvieron sometidos a una cirugía más prolongada. Estas causas dieron como resultado que los animales no se recuperaran adecuadamente y que murieran. La mayor parte de estos problemas, como la hemorragia durante la cauterización de las arterias vertebrales, la estimulación del nervio vago o la deshidratación, se redujeron substancialmente luego de la etapa de establecimiento del modelo experimental, pero otros, como las infecciones respiratorias, persistieron especialmente en algunos lotes de ratas del Bioterio y en algunas épocas del año.

La mortalidad por causas no relacionadas con la isquemia se presentó en grado variable entre los diferentes grupos experimentales, con una tendencia a presentarse en mayor proporción en los grupos

de las etapas iniciales, pero sin una relación aparente con el procedimiento quirúrgico, no existiendo diferencias significativas entre los grupos (Tabla 1).

Esta mortalidad constituyó un problema grave para el avance del proyecto, pero dado que ocurrió antes de la oclusión de las carótidas, no se consideró asociada al episodio de isquemia y por lo tanto no se incluyen estos animales en la estimación de la mortalidad por isquemia, ni en el grupo final en estudio. Doce animales más (7.4 %) murieron después de la oclusión de las carótidas, pero igualmente por causas no relacionadas con la isquemia (principalmente por infecciones respiratorias). Estos últimos animales tampoco se incluyeron en el estudio. Los datos de los 162 animales totales se presentan en la Tabla 1, en donde aparecen en el lado izquierdo los 54 animales que murieron por causas inespecíficas y en el lado derecho los 108 que se incluyeron en el estudio, identificando los que murieron durante o después del episodio de isquemia por causas relacionadas con la severidad de este episodio (con las manifestaciones que se describen más adelante) y los que sobrevivieron. El cálculo de los porcentajes de mortalidad en el lado izquierdo de la tabla se basa en el número total de animales utilizados en cada grupo, en tanto que los porcentajes presentados en el lado derecho de la tabla se calcularon con relación al número final de animales incluidos en el estudio, luego de descartar los que murieron por causas no relacionadas con la isquemia.

TABLA 1. Mortalidad (número de animales y porcentajes) de las ratas sometidas a las cuatro variantes del modelo de isquemia cerebral global aguda por "oclusión de los cuatro vasos".

Grupo y duración de la oclusión	N	Murieron por causas no relacionadas con la isquemia				N	Murieron por causas relacionadas con la isquemia				Sobrevivieron				
		Antes del episodio de isquemia		Después del episodio de isquemia			Durante el episodio de isquemia		Después, por severidad de la isquemia						
	162					108									
1: 30 min	19	4	21.1%	1	5.3%	14	2	14.3%	1	7.1%	11	78.6%			
2:	104	35	33.7%	11	10.6%	58	7	12.1%	14	24.1%	37	63.8%			
13 min							0	0%	12	0	0%	3	25.0%	9	75.0%
20 min							7	11.9%	32	6	18.8%	6	18.8%	20	62.5%
30 min							4	12.1%	14	1	7.1%	5	35.7%	8	57.1%
3:	20	1	5.0%	0	0%	19	0	0%	1	5.3%	18	94.7%			
13 min							0	0%	4	0	0%	0	0%	4	100%
20 min							0	0%	15	0	0%	1	6.7%	14	93.3%
4: 3x3 min	19	2	10.5%	0	0%	17	4	23.5%	1	5.9%	12	70.6%			

Mortalidad asociada al episodio de isquemia

De los 108 animales experimentales incluidos en el estudio, 78 sobrevivieron y 30 murieron durante la oclusión de las carótidas ($n=13$), o dentro de las 48 h siguientes ($n=17$), por causas relacionadas con la severidad de la isquemia: la mortalidad ocurrida durante la oclusión de las carótidas generalmente se manifestó por complicaciones respiratorias como presentación de ruidos respiratorios, signos de apnea (insuficiencia respiratoria), disminución de la frecuencia respiratoria y finalmente paro respiratorio. La mortalidad que ocurrió después del episodio de isquemia se produjo bajo tres diferentes circunstancias: 1) por un periodo prolongado de inconsciencia en el que los animales mostraron signos de insuficiencia respiratoria en los primeros 60 o 90 minutos y después del cual no lograron recuperar adecuadamente la conciencia, apareciendo muertos a la mañana siguiente; 2) por la aparición de crisis convulsivas dentro de las primeras 24 horas post-isquemia, muriendo dentro de ese periodo; o 3) por causas no determinadas, una vez habiendo sobrevivido 24 h y sin manifestar signos de insuficiencia respiratoria ni de actividad convulsiva. La aparición de crisis convulsivas estuvo asociada a periodos prolongados de isquemia (20 o 30 minutos) de gran severidad (con pérdida total de la conciencia), luego de los cuales los animales permanecieron inconscientes por un periodo prolongado. Los animales que sobrevivieron 48 h después de la isquemia, generalmente lograron sobrevivir hasta los 30 días o más.

La mortalidad durante la oclusión no se presentó en el grupo 3 y tuvo una frecuencia similar en los animales de los grupos 1 y 2, como se observa en la Tabla 1. Por su parte, en el grupo 4, sometido a tres periodos breves de isquemia, se observó una mayor incidencia, no significativa, de problemas respiratorios y muerte durante el episodio de isquemia en comparación con los otros grupos, que ocurrió principalmente durante el segundo o tercer periodo de oclusión de las carótidas.

La mortalidad ocurrida después del episodio de isquemia se presentó con mayor frecuencia en el grupo 2 que en los otros grupos, especialmente luego de episodios de 30 minutos de isquemia, pero la

diferencia con respecto a los otros periodos de oclusión (13 y 20 minutos) o a otros grupos no fue estadísticamente significativa. La mortalidad post-isquemia en este grupo no tuvo relación directa con la duración del periodo de oclusión de las carótidas (Tabla 1).

Cumplimiento de los criterios de éxito del modelo (Inconsciencia durante y post-isquemia)

En muchos casos los animales presentaron movimientos de resistencia durante el primer minuto luego de ocluir las carótidas, sometiéndose al cabo de este tiempo y permaneciendo inconscientes por periodos parciales o durante todo el periodo de oclusión. En cada uno de los grupos se consideró que los animales cumplieron el criterio de inconsciencia cuando no mostraron ningún movimiento o tan sólo tuvieron ligero movimiento de vibrisas o movimientos corporales débiles en periodos breves (de menos de 1 minuto) dentro del periodo de oclusión de las carótidas.

Al cabo de este periodo y después de que se restituyó el flujo en las carótidas, la mayor parte de los animales permanecieron inconscientes por periodos de duración variable en tanto que algunos recuperaron inmediatamente la conciencia y la reacción de enderezamiento. De estos últimos, sólo muy pocos quedaron después inconscientes, con pérdida de la reacción de enderezamiento.

Los animales que no cumplieron el criterio de inconsciencia durante el periodo de isquemia generalmente no quedaron inconscientes más que por periodos menores a 10 min post-isquemia. Sólo se consideró cumplido el criterio de inconsciencia post-isquemia y exitoso el modelo cuando los animales permanecieron sin recuperar la reacción de enderezamiento por periodos de más de 15 minutos, dado que sólo en estas condiciones se presentó un daño significativo en el hipocampo, como se describe más adelante.

Como se observa en la Tabla 2 y Figura 2, 30 minutos de oclusión de las carótidas en el grupo 1, sólo provocaron la pérdida de la conciencia en 5 de 12 animales durante la oclusión (41.7%) y sólo 2 permanecieron inconscientes después de ésta, por 15 y 35 minutos respectivamente.

Las ratas del grupo 2 cumplieron más adecuadamente los criterios de permanecer inconscientes durante la oclusión de las carótidas y en el periodo post-isquemia, que los grupos 1 y 4 (Tabla 2). Es interesante señalar que en este grupo, ni el porcentaje de sujetos que quedaron inconscientes, ni la duración del periodo de inconsciencia post-isquemia tuvieron relación con la duración del episodio de oclusión de las carótidas. Puede observarse que un mayor porcentaje de sujetos sometidos a sólo 13 minutos de oclusión permanecieron inconscientes durante este episodio, en comparación con los que fueron sometidos a 20 o 30 minutos de oclusión, presentando periodos de inconsciencia post-isquemia similares en los tres casos. Los valores de duración de la inconsciencia post-isquemia luego de 13 minutos de oclusión fueron en todos los casos mayores a 9 minutos y tuvieron una dispersión menor que los de los animales sometidos a periodos de oclusión más largos.

En este grupo, los periodos de 13, de 20 y de 30 minutos de oclusión de las carótidas provocaron muerte de los sujetos, especialmente asociada a periodos de inconsciencia post-isquemia mayores a 30 minutos (Fig. 2).

TABLA 2. Cumplimiento de los criterios de inconsciencia durante el episodio de isquemia y post-isquemia y duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia, de las ratas sometidas a las diferentes variantes del modelo de isquemia cerebral global aguda por "oclusión de los cuatro vasos".

Grupo y duración de la oclusión (min)	N	Inconsciencia durante la isquemia (No. %)		Inconsciencia post-isquemia (No. %)		Duración de inconsciencia post-isquemia (min; Md. rangos intercuartiles)	
1: 30	12	5/12	41.7	2/12	16.7	25.0	15.0 - 35.0
2: 13	12	11/12	91.7	12/12	100	19.8	10.3 - 29.8
	26	14/26	53.8	26/26	100	17.5	6.2 - 42.0
	13	10/13	76.9	10/13	76.9	30.0	15.0 - 61.0
3: 13	4	----	----	4/4	100	15.7	12.7 - 34.5
	14	----	----	14/14	100	11.1	5.9 - 18.0
4: 3x3min/1h	13	5/13*	38.5	7/13*	53.8	1.3	0.0 - 5.5

* Sólo se incluyen los animales que permanecieron inconscientes durante o después de por lo menos dos de los tres periodos de isquemia.

En el grupo 3, en el que la oclusión de las carótidas se realizó bajo anestesia con halotano, no fue posible, por esta razón, determinar la pérdida de la conciencia durante este episodio; sin embargo, la

mayor parte de los animales mostraron inconsciencia post-isquemia por periodos cuya duración no fue estadísticamente diferente a la que mostraron los animales del grupo 2 sometidos a periodos de oclusión de la misma duración, sin anestesia (Tabla 2, Figura 2). Sin embargo, en este grupo, luego de 20 minutos de oclusión, sólo dos animales presentaron periodos de inconsciencia mayores a 25 minutos y solamente un animal murió luego de presentar asfisia y convulsiones en los primeros 20 minutos post-isquemia.

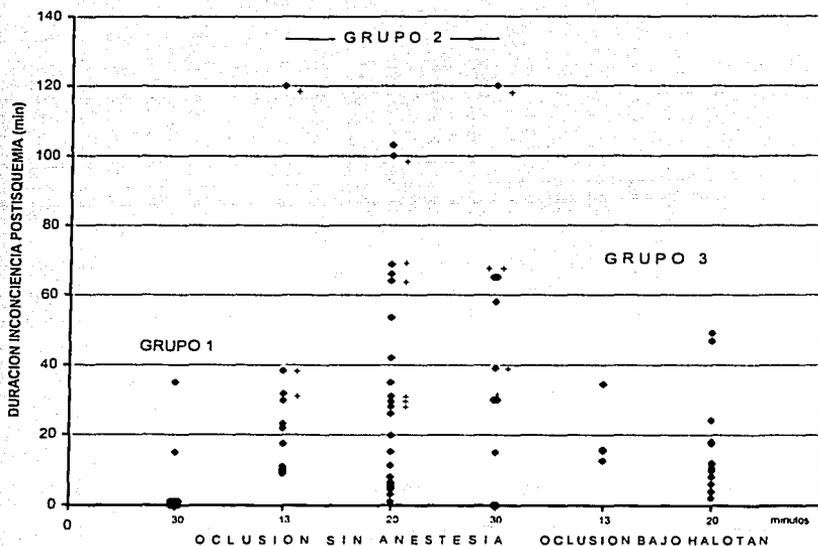


FIGURA 2. Duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia mostrados por cada sujeto de los grupos 1, 2 y 3, sometidos a 13, 20 o 30 minutos de oclusión de las carótidas. La cruz (+) identifica a los animales que murieron después de la isquemia, por severidad de la misma.

En el grupo 4, los periodos breves de oclusión de las carótidas no siempre estuvieron asociados a una pérdida total de la conciencia y sólo 5 de las 13 ratas estuvieron inconscientes durante o después (7 ratas) de por lo menos dos de los tres periodos de oclusión. Los periodos de inconsciencia post-isquemia fueron en general muy breves (Tabla 2, Figura 3).

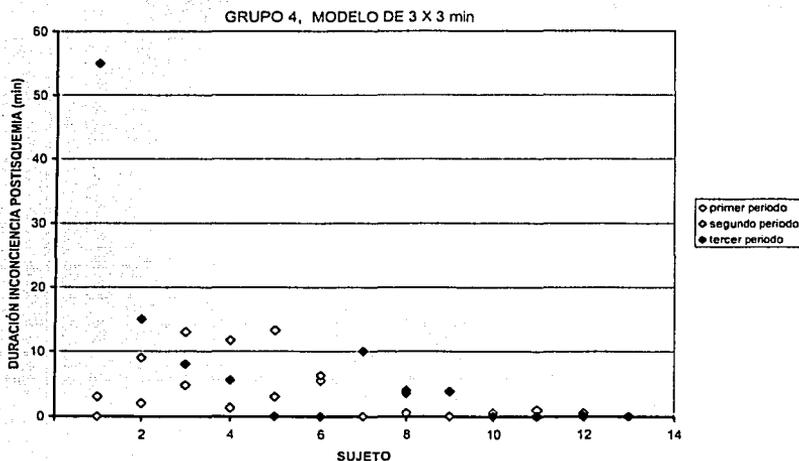


FIGURA 3. Duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia mostrados por cada sujeto del grupo 4 sometido al modelo de 3 x 3, luego de cada uno de los tres episodios de oclusión de las carótidas. Los periodos de inconsciencia post-isquemia fueron en todos los casos, muy breves.

Daño neuronal en el área CA1 del hipocampo.

Las figuras 4 y 5 muestran imágenes representativas de los diferentes grados de daño (0 a 3) provocado a la capa de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en los cerebros de los animales sometidos a las diferentes variantes del modelo de oclusión de los cuatro vasos.

SANO

ISQUEMIA

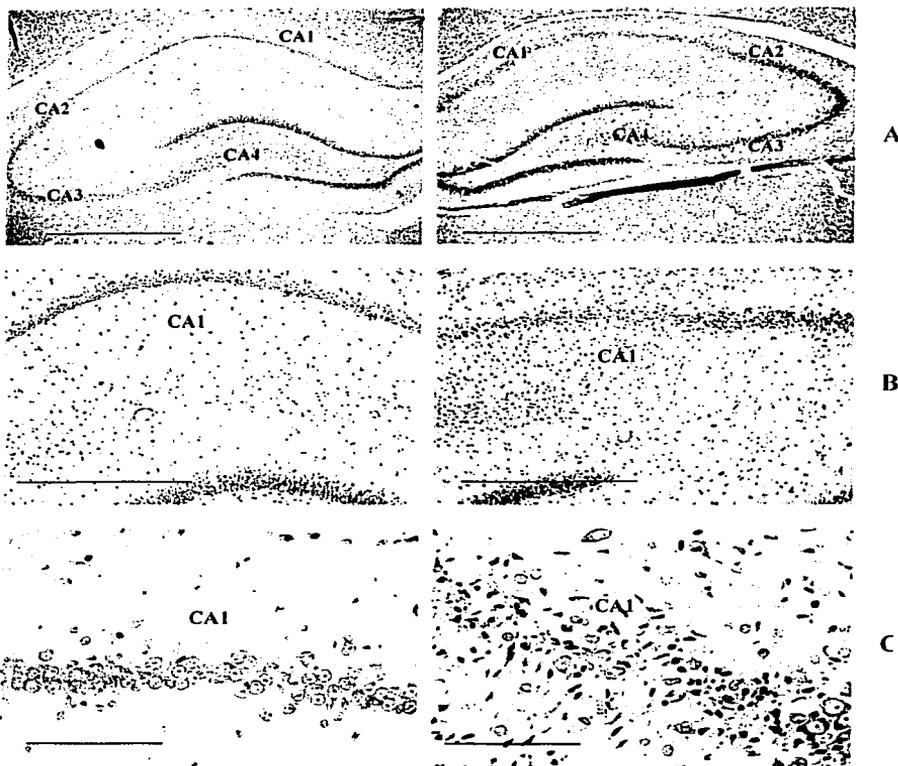


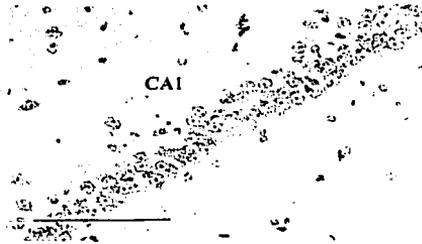
FIGURA 4. Cortes coronales teñidos con violeta de cresilo, representativos de cerebros de una rata sana y de una rata sometida a isquemia por oclusión de los cuatro vasos con daño severo en la capa de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Se observa, a diferentes aumentos (A: 40x, B: 100x y C: 400x), la despoblación neuronal y reacción glial en el área CA1 del hipocampo del animal sometido a isquemia, en comparación con el hipocampo del animal sano que muestra numerosas neuronas con morfología normal y núcleo de contenido claro. Escala de barras; A: 1000 μ m, B: 500 μ m, C: 100 μ m.

TESIS CON
FALTA LE ORIGEN

GRADO 0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRADO 1



GRADO 2

GRADO 3

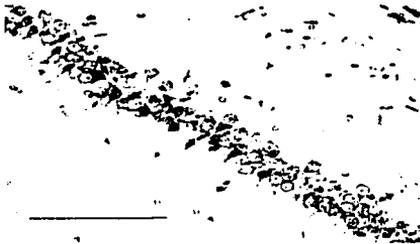


FIGURA 5. Imágenes representativas de los diferentes grados de daño en el área CA1 del hipocampo de ratas sometidas a isquemia por las diversas variantes del modelo de oclusión de los cuatro vasos. En el grado 0, sin daño, las neuronas son numerosas y con morfología normal, núcleo redondo y contenido claro. En el grado 1 de daño se observan algunas neuronas dañadas, alargadas, con núcleo ovalado y contenido denso. En el grado 2 se observa un mayor porcentaje de neuronas dañadas (20 - 50%). En la imagen del grado 3 se observa una despoblación neuronal severa y reacción glial intensa. (Tinción con violeta de cresilo, 400x). Escala de barras: 100µm.

La Tabla 3 y la Figura 6 muestran la distribución de los grados de daño neuronal en los animales sometidos a las cuatro variantes del modelo de oclusión de los cuatro vasos. Los grados de daño en el hipocampo difirieron de acuerdo con la variante del modelo y con la duración del periodo de oclusión de las carótidas y estuvieron especialmente relacionados con la duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia.

Así, en el grupo 1 sólo los dos sujetos que mostraron inconsciencia post-isquemia tuvieron daño en el área CA1 del hipocampo, que afectó a menos del 20% de las neuronas (grado 1) en ambos casos (Tabla 3, Fig.6).

En comparación con este resultado, un periodo similar, de 30 minutos de oclusión de las carótidas, pero con compresión de la musculatura cervical (grupo 2) provocó daño neuronal en el hipocampo de 6 de los 8 animales, siendo la diferencia entre los dos grupos, estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

TABLA 3. Grados de daño neuronal en el área CA1 del hipocampo de las ratas sometidas a las diferentes variantes del modelo de isquemia cerebral global aguda por "oclusión de los cuatro vasos".

Grupo y duración de la oclusión	N	Grado de daño neuronal en el área CA1 del hipocampo			
		0	1	2	3
1: 30	11	9	2	0	0
2: 13 20 30	9	0	6	3	0
	20	6	8	4	2
	8	2	2	1	3
3: 13 20	4	0	3	1	0
	14	4	8	2	0
4: 3x3min/1h	12	10	2	0	0

En el grupo 2, 13 minutos de oclusión de las carótidas provocó daño a las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en todos los animales, cuya magnitud varió entre grado 1 y 2. Por su parte, 20 y 30 minutos de oclusión provocaron mayores grados de daño neuronal (grado 3) en algunos

animales, especialmente en los que sobrevivieron luego de haber presentado periodos de inconsciencia post-isquemia mayores a una hora; en contraste, un 30% y un 25% de las ratas, respectivamente, no presentaron ningún daño (grado 0) (Tabla 3, Figura 6). No hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar el resultado de los tres periodos de oclusión (13 20 y 30 minutos).

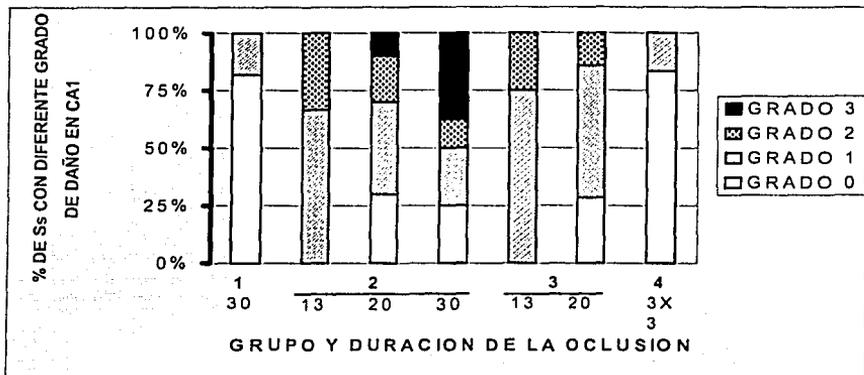


FIGURA 6. Porcentajes de animales, en cada grupo experimental sometido a las diferentes variantes del modelo de oclusión de los cuatro vasos, que presentaron distintos grados de daño neuronal en el área CA1 del hipocampo. Se observa que los animales de los grupos 2 y 3 presentaron mayores grados de daño neuronal.

En el grupo 3, 13 y 20 minutos de oclusión bajo anestesia con halotano provocaron daño neuronal de similar magnitud al provocado por periodos de oclusión de la misma duración en el grupo 2, sin anestesia.

En el grupo 4 sólo 2 animales presentaron daño neuronal en el área CA1 del hipocampo (Tabla 3, Fig. 6), siendo este resultado similar al del grupo 1 y estadísticamente diferente a los grupos 2 y 3 ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron diferencias entre las variantes del modelo de oclusión de los cuatro vasos en cuanto a la mortalidad de los sujetos, a la duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia y al grado de daño en el hipocampo.

En la descripción original del modelo de oclusión de los cuatro vasos, (Pulsinelli y cols, 1979) mencionan una incidencia de convulsiones del 40% en los animales sometidos a 30 minutos de oclusión de las carótidas y un alto porcentaje de sujetos con daño severo (grado 2 o 3) en el hipocampo. Los animales sometidos a este mismo procedimiento en nuestro estudio (Grupo 1) no mostraron convulsiones y sólo dos animales permanecieron inconscientes luego de la oclusión y tuvieron daño en el hipocampo. Esta diferencia podría deberse a la cepa de ratas utilizada, ya que aquellos autores emplean ratas Wistar, al igual que otros autores. Existen pocos estudios en los que se utiliza el modelo de isquemia por 4VO en ratas Sprague-Dawley y se ha señalado (Pulsinelli y cols, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988) que pudieran existir diferencias entre cepas e incluso entre diferentes lotes de las mismas ratas Wistar, debidas a la participación del flujo sanguíneo colateral al cerebro, a través de pequeñas ramas de las arterias espinal anterior y arterias colaterales que se localizan entre los músculos cervicales y paravertebrales.

En virtud de lo anterior, se utilizó en los grupos 2, 3 y 4 de este estudio, la modificación propuesta por Pulsinelli y Buchan (1988) de comprimir la musculatura cervical y paravertebral durante el periodo de oclusión de las carótidas. Los resultados obtenidos en estas condiciones, especialmente en los grupos 2 y 3, fueron mejores que los obtenidos en el grupo 1.

Aunque la mortalidad asociada a la severidad de la isquemia no mostró diferencias significativas entre los grupos, cabe resaltar que cuando los animales permanecieron inconscientes por más de 30 minutos post-isquemia, la mortalidad fue elevada (50% o más) y en los animales que sobrevivieron se presentó el mayor grado de daño neuronal (grado 2 o 3). Esto fue especialmente evidente en el grupo 2, en el que un número importante de los sujetos presentaron largos periodos de inconsciencia post-

isquemia. Sin embargo, 25 a 30% de las ratas sometidas a 20 o a 30 minutos de oclusión de las carótidas, no permanecieron inconscientes luego de la isquemia o sólo por periodos menores a 10 minutos, sin daño evidente en el área CA1 del hipocampo. Algo similar ha sido obtenido en los estudios del grupo de Pulsinelli (Pulsinelli y cols, 1979), ya que un alto porcentaje de sus animales presentan convulsiones (40%) y los autores establecen como un requisito para incluir a los animales sobrevivientes en el estudio, que permanezcan inconscientes por más de una hora post-isquemia, condición que permite que se presente severo daño en el hipocampo. Esto ofrece la ventaja de obtener un grado severo de daño neuronal, pero tiene la gran desventaja de que, en relación con el número de ratas totales utilizadas, se reduce considerablemente el número de ratas incluidas en el estudio. Por otra parte, es importante mencionar que en nuestro estudio, periodos de 13 minutos de oclusión de las carótidas fueron más exitosas, ya que estuvieron asociadas con periodos más largos de inconsciencia post-isquemia (mayores a 10 minutos) que los periodos de 20 o 30 minutos de oclusión y provocaron un daño neuronal menos severo (1 o 2) pero más uniforme en el hipocampo. Este hecho se puede deber a que, en los animales que fueron sometidos a 20 o 30 minutos de oclusión; a pesar de haber comprimido la musculatura cervical y paravertebral, el flujo colateral incrementado por el aumento de la presión arterial al ocluir las carótidas permitió un aporte sanguíneo al cerebro suficiente como para restituir gradualmente la función cerebral y por tanto no se presentó un periodo prolongado de inconsciencia post-isquemia. Sólo en los animales en los que esto no ocurrió, se presentó un periodo prolongado de inconsciencia y un daño neuronal severo. En los animales sometidos a 13 minutos de oclusión, posiblemente el flujo colateral no se incrementó en forma suficiente como en los animales sometidos a 20 y 30 minutos de oclusión.

El modelo en el que se realizó la oclusión de las carótidas bajo anestesia con halotano (grupo 3), que tuvo, en términos generales, un resultado similar a la oclusión sin anestesia, ofreció la ventaja de que se presentara una mortalidad muy baja, que coincide con lo descrito por Schmidt-Kastner y cols (1997), quienes observaron en un modelo similar, una menor incidencia de crisis convulsivas post-

isquemia. Sin embargo, la baja mortalidad tal vez sea debida al hecho de que la severidad de la isquemia fuera menor, a juzgar por la ausencia de periodos prolongados de inconsciencia post-isquemia. Además, este procedimiento tiene la desventaja de no poder identificar, durante el episodio de isquemia, el grado de supresión de la irrigación cerebral a partir de la pérdida de la conciencia.

El modelo de isquemia breve repetida (3 x 3) utilizado en este estudio en el grupo 4, además de ser el que toma más tiempo para su realización, no fue exitoso ya que se obtuvieron resultados muy limitados en cuanto al daño neuronal en el hipocampo. Esto contrasta con lo reportado por otros autores (Nakano y cols, 1989) quienes 7 días después de la isquemia describen una reducción a menos del 20% en el número de neuronas piramidales en CA1. Esta diferencia podría atribuirse a una mayor participación del flujo colateral hacia el cerebro en la cepa de ratas que se utilizó en el presente estudio a diferencia de la utilizada por los otros autores (Wistar).

Basados en estos resultados, la variante del modelo de isquemia cerebral que ofrece las mayores ventajas es la utilizada en el grupo 2, con 13 minutos de oclusión sin anestesia y limitando la circulación colateral al cerebro mediante la compresión de la musculatura cervical.

9. CONCLUSIONES

- 1) La compresión de la musculatura cervical para limitar la circulación colateral al cerebro durante la oclusión de las carótidas permitió un mayor cumplimiento de los criterios de inconsciencia durante y post-isquemia y un mayor daño neuronal en el hipocampo.
- 2) No se encontró una relación directa entre la duración del periodo de oclusión de las carótidas y la duración de los periodos de inconsciencia post-isquemia o el grado de daño en el hipocampo.
- 3) La duración del periodo de inconsciencia post-isquemia tuvo relación con la severidad de la isquemia y por lo tanto fue un buen indicador del daño neuronal en el hipocampo.
- 4) La anestesia con halotano durante la oclusión de las carótidas estuvo asociado con una menor mortalidad de los sujetos, pero no redujo el flujo sanguíneo colateral al cerebro, a juzgar por la duración similar de los periodos de inconsciencia post-isquemia a los de los sujetos sin anestesia.
- 5) El modelo de isquemia breve repetida (3 x 3) estuvo asociado con una baja mortalidad post-isquemia pero no provocó una isquemia severa, no encontrándose daño neuronal significativo en el hipocampo.
- 6) El modelo de 13 minutos de oclusión de las carótidas sin anestesia y limitando la circulación colateral al cerebro mediante la compresión de la musculatura cervical es el más adecuado para provocar un daño moderado pero consistente en el área CA1 del hipocampo, pudiéndose utilizar en estudios de neuroprotección .

APÉNDICE

10. APENDICE

Procesamiento histológico de los cerebros.

Se decantó el formol en el que se fijó el corte de cerebro y se enjuagó con agua destilada. En los pasos siguientes se midió el tiempo con cronómetro y se mantuvo la muestra en un horno cuya temperatura fue de 60°. Se agitaron los frascos cada 3 minutos aproximadamente para ir recambiando la superficie de contacto del tejido con medio líquido renovado.

- a) alcohol de 70°, 30 minutos
- b) alcohol de 96°, 30 minutos
- c) alcohol de 96°, 30 minutos
- d) alcohol absoluto, 30 minutos
- e) alcohol absoluto, 30 minutos
- f) xilol-alcohol absoluto (1:1), 20 minutos
- g) xilol, 20 minutos
- h) xilol, 20 minutos
- i) parafina, 30 minutos
- j) parafina, 30 minutos
- k) inclusión en parafina.

En un molde se vertió parafina líquida, se colocó el bloque de cerebro y se acomodó para que quedara plano. Al transcurrir algunos minutos, se sumergió una etiqueta de reconocimiento de la muestra y se permitió la solidificación de la parafina.

Tinción con violeta de cresilo:

Se acomodaron los cortes tomados del microtomo en un portaobjetos y se extendió con un pincel. Se adhirieron los cortes con solución de albúmina y se dejó secar.

Se desparafinó en un horno a 60°.

Los pasos siguientes se efectuaron midiendo el tiempo con un cronómetro.

- a) xilol, 5 minutos
- b) xilol, 5 minutos
- c) alcohol absoluto, 5 minutos
- d) alcohol de 95°, 5 minutos
- e) alcohol de 95°, 5 minutos
- f) alcohol de 70°, 5 minutos
- g) agua destilada, 5 minutos
- h) violeta de cresilo, 10 minutos
- i) agua destilada, 15 minutos
- j) alcohol de 75°, 15 minutos
- k) alcohol de 95°, 5 minutos
- l) alcohol absoluto, 5 minutos
- m) alcohol absoluto, 5 minutos
- n) xilol, 5 minutos
- o) xilol, 5 minutos
- p) Montaje con resina y cubrir con cubreobjetos

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beck T, Lutz B, Thole U, Wree A. Assessing chronic brain damage by quantification of regional volumes in postischemic rat brains. *Brain Res* 1993; 605:280-286.
- Bleyaert AL, Nemoto EM, Safar P, Stezoski W, Mickel JJ, Moossy J, Rao GR. Thiopental amelioration of brain damage after global cerebral ischemia in monkeys. *Anesthesiol* 1978; 49:390-398.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7:729-738.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Ginsberg MD. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett* 1989; 101:299-304.
- Capdeville C. Méthodes d'appréciation du déficit neurologique induit par une ischémie cérébrale transitoire chez le rat éveillé. *J Pharmacol (Paris)* 1984; 15:231-237.
- Cervantes M, Ruelas R, Sánchez R, Alvarez-Resendiz G. Brain injury following cardiorespiratory arrest in cats. Effects of Alphaxolone-Alphadolone. *Bol Estud Med Biol* 1989; 37:17-27.
- Cervantes M, Ruelas R, Chávez-Carrillo I, Contreras-Gomez A, Antonio-Ocampo A. Effects of propofol on alterations of multineuronal activity of limbic and mesencephalic structures and neurological deficit elicited by acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res* 1995; 26:385-395.
- Cervantes M, González-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res* 2002; 33:6-14.

- Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7:369-379.
- Clifton GL, Taft WC, Blair RE, Choi SC, Delorenzo RJ. Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke* 1989; 20:1545-1552.
- Cottrell JE. Possible mechanisms of pharmacological neuronal protection. *J Neurosurg Anesthesiol* 1995; 7:31-37.
- Davies MG, Hagen P. The vascular endothelium. *Annals Surg* 1993; 218:593-609.
- Dunn SM, Botenson AN, Martin IL. Molecular neurobiology of the GABA_A receptor. En: *International review neurobiol* 1994; 36:51-93.
- Gisvold SE, Safar P, Hendrick HL, Rad G, Moosy J, Alexander H. Thiopental treatment after global brain ischemia in pigtailed monkeys. *Anesthesiol* 1984; 60:88-96.
- González-Vidal MD, Cervera-Gaviria M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res* 1998; 29:117-124.
- Haddad GG, Jiang C. O₂ deprivation in the central nervous system: On mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Progr Neurobiol* 1993; 40:277-318.
- Hallmayer J, Hossman A, Mies G. Low dose of barbiturate for prevention of hippocampal lesion after brief ischemic episode. *Act Neuropathol* 1985; 68:7-31.
- Hansen AK, Lundback J. Ion distributions in brain during ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 1989; 1: 353-356.
- Hara H, Sukamoto T, Kogure K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Progress in Neurobiology* 1993; 40:645-670.
- Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, Avendaño C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assessment. *Neuroscience* 1999; 93:71-80.

- Hossmann KA.. Hemodynamics of postischemic reperfusion of the brain. En: Current neurosurgical practice: Protection of the brain from ischemia. Weinstein PR, Faden AL. (Eds). Williams and Wilkins. Baltimore. 1990. pp. 21-36.
- Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC. To what extent have functional studies of ischemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? TIPS 1998; 19: 59-66.
- Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatz I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. Acta Neuropath (Berl.) 1975; 32:209-223.
- Jiang N, Chopp M, Stein D, Feit H. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. Brain Res 1996; 735:101-107.
- Johansen FF, Diemer NH. Enhancement of GABA neurotransmission after cerebral ischemia in the rat reduces loss of hippocampal CA1 pyramidal cells. Acta Neurol Scand 1991; 84:1-6.
- Kameyama M, Susuki J, Shirane R, Ogawa A. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat- Three vessel occlusion model. Stroke 1985; 16:489-493.
- Kato K, Kogure K, Nakano S. Neuronal damage following repeated ischemia in the gerbil. Brain Res 1989; 479:366-370.
- Kenneth PM. Effects of γ -aminobutyric acid modulation on neuronal ischemia in rabbits. Stroke 1994; 25:2271-2275.
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 1982; 239:57-69.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemia cell damage. En: Molecular mechanisms of

ischemia brain damage. Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds). *Progress in Brain Res.* New York. Vol 63, 1985. pp.39-58.

- Kogure K, Tanaka J, Araki T. The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathol* 1988; 9:145-170.
- Letechipia-Vallejo G, González-Burgos I, Cervantes M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res* 2001; 32:186-192.
- McBean DE, Kelly PAT. Rodent models of global cerebral ischemia: A comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmac* 1998; 30:431-434.
- Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML, Siesjö BK. The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10:365-374.
- Mitani A, Andou Y, Matsuda S, Arai T, Sakanaka M, Kataoka K. Origin of ischemia-induced glutamate efflux in the CA1 field of the gerbil hippocampus: An in vivo brain microdialysis study. *J Neurochem* 1994; 63:2152-2164.
- Moller F, Smith ML, Siesjö BK. Effect of hypothermia on ischemic brain damage, a comparison between preischemic and postischemic cooling. *Neurosci Res Commun* 1989; 5:87-94.
- Murakami K, Kondo T, Epstein CL, Chan PH. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 1997; 28:1797-1804.
- Nakano S, Kato H, Kogure K. Neuronal damage in the rat hippocampus in a new model of repeated reversible transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1989; 178-180.

- Nakano S, Kogure K, Fujikura H. Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience* 1990; 38:115-124.
- Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992; 6:2311.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. N.York, 1986.
- Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Stroke* 1992; 339:533-536.
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10:267-272.
- Pulsinelli W, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11:491-498.
- Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: Method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 1988; 19:913-914.
- Roine RO. Global cerebral ischemia. En: Fisher M, Bogoslavsky J, eds., *Current Reviews Cerebrovascular Dis., Current Medicine*. Philadelphia, 1997. pp. 159-164.
- Rupprecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* 1999; 22:410-416.
- Saji M, Reis DJ. Delayed transneuronal death of substantia nigra neurons prevented by γ -aminobutyric acid A agonist. *Science* 1987; 235:66-69.
- Sarraf-Yazdi S, Laskowitz D, Warner DS. Pathophysiology of ischemic brain damage. En: Shuaib A, Goldstein LB, eds., *Management of Acute Stroke*, Marcel Dekker. N. York, 1999. pp. 243-277.

- Schmidt-Kastner R, Fliss H, Hakim AM. Subtle neuronal death in striatum after short forebrain ischemia in rats detected by in situ end-labeling for DNA damage. *Stroke* 1997; 28:163-170.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991; 40:599-636.
- Selye H. Anaesthetic effects of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 46: 116-121.
- Siesjö BK, Katsura K, Kristián T. The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol* 1995; 7:47-52.
- Shapiro HM. Barbiturates in brain ischemia. *Br J Anaest* 1985; 57:82-95.
- Shuaib A, Ijaz S, Hasan S, Kalra J. Gamma-vinyl GABA prevents hippocampal and substantia nigra reticulata damage in repetitive transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1992; 590:13-17.
- Shuaib A, Ijaz S, Kanthan R. Clomethiazole protects the brain in transient forebrain ischemia when used up to 4 h after the insult. *Neurosci Lett* 1995; 197:109-112.
- Smith SS. Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 1991; 42:309-320.
- Sugio K, Horigome N, Sakaguchi T, Goto M. A model of bilateral hemispheric ischemia- Modified four-vessel occlusion in rats (letter). *Stroke* 1983; 14:832-833.
- Susuki R, Yamaguchi T, Inaba Y, Wagner HG. (1985). Microphysiology of selectively vulnerable neurons. En: *Molecular mechanisms of ischemic brain damage*. Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds.). Progress in Brain Research. Elsevier Science Publ. Co., New York. 63:59-68.

- Todd MM, Chadwick HS, Shapiro HM, Dunlop BJ, Marshall LF, Dueck R. The neurologic effects of thiopental therapy following experimental cardiac arrest in cats. *Anesthesiology* 1982; 57:76-87.
- Tomida S, Nowak J, Vass K, Lohr JM, Klatzo I. Experimental model for repetitive ischemic attacks in the gerbil: the cumulative effect of repeated ischemic insults. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7:773-782.
- Wagner SR, Lanier WL. Metabolism of glucose, glycogen, and high-energy phosphates during complete cerebral ischemia. *Anesthesiol* 1994; 81:1516-1526.
- Wieloch T. Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Progress in Brain Res* 1985; 63:69-85.