

Valoración de la fiabilidad de los test neurológicos en modelos de ictus isquémico en roedores

Irene Turiel García. Eva Álvarez Torres. Fernando Arnáiz Guerrero.

Grado en Medicina. Tercer curso. Universidad Complutense de Madrid.
ireneturiel_13@hotmail.com

Macarena Hernández Jiménez. Ignacio Lizasoain Hernández. M^a Ángeles Moro Sánchez.

Dpto. de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.
ignacio.lizasoain@med.ucm.es

Resumen: el ictus es la enfermedad neurológica de mayor prevalencia y presenta una gran morbilidad y alto riesgo de mortalidad. Para estudiarla se han desarrollado distintos modelos animales; siendo los roedores un ejemplo excelente. Nuestro objetivo es valorar la fiabilidad de tres test neurológicos: *beam walking*, *cylinder test* y *the modified Neurological Severity Scale (mNSS)* en ratones Swiss tras una isquemia. Nuestros resultados sugieren que a pesar de que la población analizada es pequeña, *cylinder test* y *mNSS* muestran una diferencia estadísticamente significativa en las poblaciones SHAM y pMCAO a las 24 y 48h postisquemia mientras que el *beam walking* sólo mostró diferencias estadísticamente significativo a las 48 postisquemia.

Palabras clave: ictus. Isquemia. ACM. Test neurológico.

INTRODUCCIÓN

El ictus o enfermedad cerebrovascular aguda (ECV) es el trastorno neurológico más común y con un elevado riesgo de mortalidad (1). Distinguimos dos principales tipos de ictus; (a) isquémico en el que el flujo sanguíneo inadecuado provoca un área circunscrita de infarto cerebral, y (b) hemorrágico en el que una extravasación sanguínea en el parénquima cerebral, o en el espacio subaracnoideo, produce lesión y desplazamiento de las estructuras cerebrales (2). Nosotros nos centraremos en el estudio del ictus isquémico por ser el más frecuente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sitúa la incidencia promedio mundial de la enfermedad en alrededor de 200 casos nuevos por cada 100.000 habitantes. Sin embargo, numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto diferencias marcadas en la incidencia, siendo ésta mayor en los países del norte de Europa que en los del sur. En España, las enfermedades cerebrovasculares suponen la primera causa de

muerte en mujeres y la segunda en varones (detrás del infarto agudo de miocardio); además es la segunda causa de demencia después del Alzheimer (2).

Esta enfermedad conlleva graves secuelas que dependen del territorio infartado; en el caso de la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) las secuelas típicas son: *hemianestesia, hemianopsia y hemiplejia* (3). Con el objeto de encontrar un tratamiento que disminuya el daño neurológico y mejore la calidad de vida del paciente, se han realizado hasta la fecha numerosos estudios en modelos experimentales de ictus usando roedores. Estos modelos son excelentes para el estudio del ictus, ya que son muy parecidos -en muchos aspectos- a lo que padecen los pacientes.

Tras hacer una revisión de la bibliografía, partimos de la hipótesis de que algunos de los test neurológicos, descritos para ratones como el: *beam walking, cylinder test y the modified Neurological Severity Scale (mNSS)* son test fiables para medir el deterioro funcional tras una isquemia. Para comprobarla, realizamos los tres test a 8 ratones swiss macho de 30-35g de peso, inmediatamente después de que nuestra tutora indujera una isquemia en 4 de ellos utilizando el método de ligadura de la ACM (pMCAO, permanent Middle Cerebral Artery Occlusion) y, a los 4 ratones restantes, se les hiciera una intervención quirúrgica simulada (SHAM). Se repitieron los test a las 24 y 48 horas tras la cirugía. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se realizó la extracción del cerebro y se hicieron cortes coronales de 1mm de grosor de los cerebros que fueron teñidos con TTC (triphenyltetrazolium chloride). Finalmente, se midió el volumen de infarto, utilizando el programa Image J.

ISQUEMIA CEREBRAL Y TIPOS DE DAÑO ISQUÉMICO

La isquemia cerebral consiste en la lesión del parénquima cerebral producido tras un periodo de falta de aporte de oxígeno y nutrientes. Existen dos tipos básicos de isquemia cerebral: *global* (afecta a todo el cerebro), que suele aparecer tras parada cardíaca, y *focal* (a un solo territorio vascular) tras la oclusión de una arteria cerebral. El 65% de los ictus se dan en el territorio de arteria cerebral media (ACM) (4).

Este estudio se centrará en el tipo de isquemia más frecuente, la focal. En estos casos se identifican en el parénquima dos zonas concéntricas: un núcleo central con déficit funcional y estructural grave e irreversible, y una zona periférica conocida como “penumbra isquémica”, en la que hay pérdida de función pero no afectación estructural irreversible (5). La isquemia secundaria a la oclusión arterial no es un fenómeno de todo o nada sino que, cuanto más se prolonga dicha oclusión, más células se lesionan y más grave es el déficit. La intensidad de la lesión estará, por tanto, marcada por el grado de reducción de flujo y la duración de la oclusión (5).

Los modelos experimentales tratan de simular las condiciones observadas en la práctica clínica permitiendo investigar la fisiopatología de la enfermedad. Para que estos

modelos sean útiles deben cumplir las siguientes características (5): (a) simular las condiciones de isquemia cerebral humana; (b) sencillo de realizar y mínimamente invasivo; (c) poca interferencia en los parámetros fisiológicos del animal; (d) baja variabilidad entre los animales de un mismo estudio; (e) baja variabilidad entre los resultados de estudios de diferentes investigadores; (f) bajo coste; (g) ofrecer posibilidad de restaurar la vascularización (reperfusión) tras fase de isquemia.

Modelos animales de isquemia cerebral focal: consisten en la oclusión del flujo distal en el territorio de una sola arteria cerebral. La mayoría de los modelos se han centrado en reproducir el infarto isquémico en el territorio de la ACM, ya que es en esta zona donde con más frecuencia se producen los ictus humanos. Existen cuatro modelos: *a)* oclusión de arteria carótida común (ACC); *b)* oclusión de ACM; *c)* oclusión microvascular de ACM; y *d)* infartos espontáneos inducidos en una cepa de ratas espontáneamente hipertensas.

De entre los modelos descritos, en el departamento se realiza el modelo de *oclusión transcraneal de la ACM* ya que, actualmente, es considerado como el que más se asemeja al ictus focal humano, y por ello los utilizamos para valorar la validez de los test neurológico. En este modelo se produce una isquemia en todo el territorio de la arteria, incluyendo los ganglios basales, irrigados por las arterias lenticuloestriadas que, a diferencia del resto de ramas, son terminales y no dan colaterales que puedan compensar un fallo de las mismas. La técnica consiste en la oclusión de la arteria tras su exposición por craneotomía. Si se hace proximal a la salida de las ramas lenticuloestriadas, el infarto será mayor, y la variabilidad entre animales también, además de que el proceso quirúrgico es más invasivo. Por ello se prefiere realizar la ligadura distalmente a las lenticuloestriadas. La secuencia es la siguiente: practicar craneotomía a la altura del tronco de la ACM, sobre la fisura rinal; exponer tronco de la ACM en el área cortical, utilizando un microscopio quirúrgico para mejor visualización (a esta altura se divide en sus ramas frontal y parietal); abrir duramadre y ligar arteria; confirmar visualmente la interrupción del flujo; y oclusión permanente de una ACC en el cuello, para evitar el efecto de la circulación colateral y los posibles efectos compensatorios que disminuirían el calibre del infarto.

DESCRIPCIÓN DE LOS TEST REALIZADOS

Beam walking o test de equilibrio en la barra: sirve para evaluar la coordinación motora, fue descrito por primera vez por Feeney (para revisión ver 5-8). Consiste en observar la capacidad de los roedores para atravesar una barra fija de madera de 70 cm, evaluando el equilibrio del animal al hacerlo. Para ello nos fijamos en el tiempo que tarda el ratón en andar sobre la barra, en la posición del rabo del ratón y en cuántas veces se resbala la extremidad derecha (slips) para así poder comparar tras la isquemia. Observamos la pata derecha ya que esperamos una disfunción en el hemicuerpo

contralateral a la lesión y dicha lesión la hemos producido en el hemisferio izquierdo cerebral.

Test del cilindro (cylinder test): se conoce también como test de asimetría de la utilización de las extremidades. Se utiliza para evaluar el uso de las extremidades y las asimetrías existentes durante la actividad exploratoria. Para ello, se coloca al roedor en un cilindro transparente y se graba la actividad exploratoria. Se registran dos comportamientos: contacto simultáneo o independiente de la extremidad anterior izquierda o derecha con la pared, cuándo el roedor se eleva sobre sus patas traseras o cuándo se inicia un movimiento lateral; o bien, contacto simultáneo o independiente de la extremidad anterior izquierda o derecha con el suelo después de que el roedor ha estado elevado sobre sus patas traseras (para revisión ver 5-8).

The modified Neurological Severity Scale (mNSS): evalúa el déficit motor y sensorial, el equilibrio y los reflejos. Se puntúa a la imposibilidad de realizar una tarea correctamente o a la ausencia de signo, dando un máximo de 14 puntos en ratones (5-8).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El estudio es doble ciego, de tal forma, que no sabemos la intervención a la que ha sido sometido cada uno de los ratones. Se estableció el volumen del infarto con posterioridad al análisis de los datos, confirmando que los animales SHAM no mostraban tejido infartado y que los pMCAO presentaban un porcentaje de hemisferio infartado de $19.2 \pm 2.1\%$ (fig. 1). El test estadístico aplicado ha sido un ANOVA de una vía.

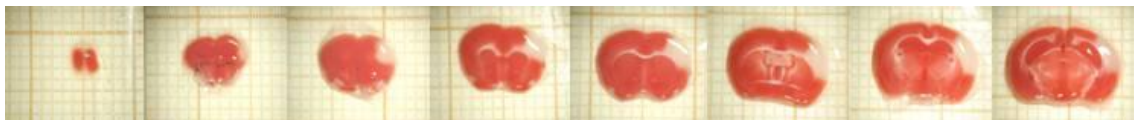


Figura 1. Tinción TTC de cerebro isquémico a las 48h postisquemia.

Beem Walking: Para la evaluación del equilibrio en barra se tomaron los datos de número de resbalones (slips) en la pata derecha. En la figura 2A podemos observar que el número de slips a las 24h aumenta en ambos grupos aunque no de forma significativa, siendo mayor en el grupo pMCAO. A las 48h postquirúrgicas, el grupo SHAM retorna a valores basales, mientras que el grupo pMCAO permanecen significativamente elevados.

Cylinder test: No se han observado cambios significativos en la simetría de la utilización de las extremidades (datos no mostrados). En cuanto al grado de actividad exploratoria, medida como número de veces que se levanta sobre las patas traseras, podemos observar en la figura 2B que disminuye significativamente en animales pMCAO tanto a 24 como a 48h.

The modified Neurological Severity Scale (mNSS): observamos un aumento significativo en el grupo pMCAO con respecto a su medida basal tanto a 24 como a 48h (fig.2C).

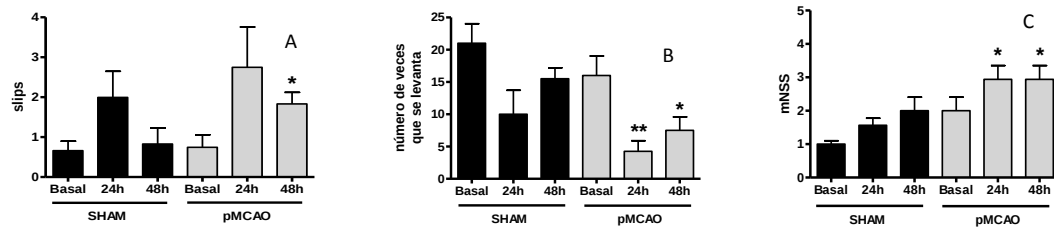


Figura 2. Slips por minuto (A); actividad exploratoria (B) y resultados de la mNSS (C) en SHAM y pMCAO.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que en las condiciones de nuestro estudio, *mNSS* y el *cylinder test* son fiables para la evaluación de los déficits neurológicos a las 24 y 48h postinfarto, y por tanto deben seguir siendo utilizados en posteriores estudios. Sin embargo, el *Beem Walking* sólo mostró diferencias estadísticamente significativas a las 48h postinfarto, por lo que creemos que se podría utilizar para estudiar la evolución aunque esto no se puede afirmar sin un estudio más profundo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz-Guzmán J. Incidencia de ictus en España. Bases metodológicas del estudio Iberictus. *Rev Neurol*. 2008. 47: 617-623
2. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010. 67:181-98.
3. Medicine at a Glance. Ed. Patrick Davey. 3rd edition, 2010. Blackwell Publishing LTD. Oxford. UK.
4. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA. Experimental models of cerebral ischemia. *Rev Neurol*. 2008. 47: 414-426
5. Zarruk JG, Garcia-Yebenes I, Romera VG, Ballesteros I, Moraga A, Cuartero MI, Hurtado O, Sobrado M, Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Serena J, Castillo-Melendez M, Moro MA, Lizasoain I. Neurological tests for functional outcome assessment in rodent models of ischaemic stroke. *Rev Neurol* 2011. 53: 607-618.

6. Liu F, McCullough LD. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:464701. Epub 2011 Jan 23.
7. Bouët V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol*. 2007. 203:555-67.
8. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med*. 2010. 2:13.

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.