

Alteraciones conductuales y del metabolismo oxidativo en un modelo de hipoperfusión cerebral transitoria inducido en ratas

✉ Rocío García¹, María E González², Ivette Fernández³, Yuselis Castaño⁴, Mei-Li Díaz⁴, Esteban Alberti¹

¹Departamento de Neurobiología, Centro Internacional de Restauración Neurológica, CIREN Ave. 25 #15805, Playa, CP 11 300, Ciudad de La Habana, Cuba

²Departamento de Neurobioquímica

³Departamento de Neurofisiología Experimental

⁴Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH
E-mail: rociogminiet@infomed.sld.cu

RESUMEN

El efecto de la hipoperfusión cerebral sobre el metabolismo oxidativo en el hipocampo, la corteza y el cuerpo estriado aún no se conoce. Poco se han estudiado las alteraciones que provoca la oligoemia sobre la memoria de referencia y de trabajo. Mediante oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes, y sin maniobras de hipotensión se indujo la oligoemia en ratas. A los 15 días de la lesión se determinó la actividad de la superóxido dismutasa, la catalasa y la concentración de malondialdehído en homogenados del hipocampo, la corteza y el cuerpo estriado. Las alteraciones conductuales se evaluaron mediante la prueba del laberinto acuático de Morris. El evento isquémico indujo un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad de la superóxido dismutasa y de la concentración de malondialdehído en la corteza cerebral. Los animales lesionados mostraron una disminución significativa de la latencia de escape ($p < 0.01$) y de la retención ($p < 0.05$). Los resultados de este estudio evidencian que las determinaciones de los parámetros oxidativos en la corteza y la evaluación de la memoria y el aprendizaje, son herramientas útiles para evaluar el alcance de la lesión provocada por la oclusión de las carótidas sin maniobras de hipotensión en ratas y validar el modelo experimental.

Palabras clave: catalasa, conducta, isquemia cerebral, laberinto acuático de Morris, malondialdehído, oligoemia, superóxido dismutasa

Biotechnología Aplicada 2008;25:332-338

ABSTRACT

Behavioral and oxidative metabolism disorders in a model of transient induced cerebral hypoperfusion in rats. The effect of cerebral hypoperfusion on the oxidative metabolism of the hippocampus, cortex, and the striatum remains unknown, and the alterations induced by oligoemia on both reference and work memories have been poorly studied. In this study we induced oligoemia in rats by bilateral occlusion of the common carotid arteries, without hypotension. After 15 days we measured catalase and superoxide dismutase activity, and the concentration of malondialdehyde in homogenates from the hippocampus, cortex, and striatum. Behavioral alterations were evaluated using the Morris water maze test. The ischemic event produced a significant increase ($p < 0.05$) in superoxide dismutase activity and the concentration of malondialdehyde at the cerebral cortex. Animals with brain injury showed a significant decrease in escape latency in finding the platform ($p < 0.01$) and retention ($p < 0.05$). The results of this study shows that the determination of oxidative stress indicators at the cortex and the evaluation of memory and learning are useful tools for estimating the extent of the damage produced by carotid occlusion without hypotension in rats, as well as for the validation of this experimental model.

Keywords: catalase, behavior, cerebral ischemia, Morris water maze, malondialdehyde, oligemia, superoxide dismutase

Introducción

Las enfermedades cerebrovasculares constituyen la tercera causa de muerte a nivel mundial y una de las principales causas de discapacidad [1]. Por esta razón, se hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, lo cual trae aparejado el desarrollo de modelos animales experimentales, importantes para predecir el valor y el efecto de estos tratamientos en los seres humanos. Se han desarrollado modelos de isquemia cerebral en muchas especies animales; sin embargo, la rata es la que presenta mayor similitud con el hombre por la anatomía de la circulación intracerebral. Esta ventaja ha determinado que los modelos en ratas sean los más usados para estudiar las enfermedades cerebrovasculares [2].

El método clásico de lograr la isquemia global en ratas es el de la oclusión de los cuatro vasos sanguíneos, las dos arterias vertebrales de manera permanente y las dos arterias carótidas comunes (ACC), de manera transitoria. No obstante, este modelo presenta desventajas asociadas a la complejidad del proceso quirúrgico y la alta mortalidad que se alcanza [3, 4]. Otro de los modelos de isquemia con afectación del cerebro anterior, incluye la oclusión bilateral de las ACC. Partiendo de que las ratas poseen una rica y extensa circulación colateral debido a la presencia del polígono de Willis [5], se han desarrollado maniobras de hipotensión arterial [6, 7] y selección genética de líneas hipertensivas [8] para alcanzar una mayor efectividad

1. Alexandrova M, Bochev P. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005;39:297-316.

2. Peña PG, Díaz AH, Torres JL. Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna. *Rev Neurol* 2004;39:1011-16.

3. López F, Hernández J, López R, Alarcón E, Martínez JF. Actividad de la cobre-zinc superóxido dismutasa en un modelo de lesión cerebral isquémica global sin hipotensión. *Neurocirugía* 2004;15:151-8.

del proceso isquémico. Sin embargo, estas maniobras dificultan y elevan el costo de los experimentos. Los modelos de oclusión bilateral de las ACC, ya sean transitorios o permanentes, sin maniobras de hipotensión, se han usado muy poco [5, 9]. De ambos modelos, el que se alcanza por oclusión transitoria tiene la ventaja de que mantiene la integridad de la vasculatura cerebral y permite el estudio de los efectos de la reperfusión.

La reducción del flujo sanguíneo en el modelo de doble oclusión de las carótidas, sin maniobras de hipotensión, no induce muerte neuronal [10]. Por tal razón, muchos autores consideran la oclusión bilateral de las ACC en ratas, más que un modelo de isquemia global, un modelo de oligoemia [10-12]. El término oligoemia se refiere a la reducción del flujo sanguíneo cerebral que desencadena procesos neurotóxicos y afecta la memoria y el aprendizaje. Este evento tiene lugar en la región de penumbra de los infartos cerebrales, en la afectación vascular de la enfermedad de Alzheimer y en personas de edad avanzada [13].

El cerebro resulta particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a que consume gran cantidad de oxígeno corporal y a que contiene elevadas concentraciones de hierro y otros sustratos fácilmente oxidables como ácidos grasos poli-insaturados y catecolaminas [14]. Como consecuencia del evento isquémico, ocurre un incremento marcado de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (radical anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito) que se acentúa con la reperfusión [1]. El radical anión superóxido y el radical hidroxilo provocan daño oxidativo en las membranas celulares, lo cual lleva a la pérdida progresiva de su fluidez y de su integridad bioquímica y estructural: este proceso se denomina peroxidación lipídica [15]. Para hacer frente a las ERO, el cerebro se vale de sistemas enzimáticos de defensa antioxidantes, que neutralizan estas especies de alta reactividad. Este sistema de defensa depende de la acción cooperativa de enzimas intracelulares, entre las que se incluyen la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) [16].

Se ha sugerido que las áreas más susceptibles al daño oxidativo provocado por la isquemia incluyen el hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza [16]. Sin embargo, los estudios acerca de las alteraciones del metabolismo oxidativo en estas áreas, en animales sometidos a oclusión de las ACC, han sido con homogenizados cerebrales con 24 horas de reperfusión como máximo [3, 9, 12, 13, 17]. Este modelo también ha sido validado en estudios anteriores mediante la evaluación de los trastornos conductuales [9, 13]. Tales estudios han demostrado que la afectación de la memoria, como consecuencia de la reducción del flujo sanguíneo, se constata 24 horas después de provocada la lesión y se mantiene durante 13 meses [9, 13]. Por esta razón, nuestra investigación estuvo encaminada a evaluar el grado de estrés oxidativo en las áreas más susceptibles al daño oxidativo (el hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza) y las alteraciones de la memoria a corto y largo plazo en ratas sometidas a oclusión bilateral de las ACC sin maniobras de hipotensión.

Materiales y métodos

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas de la línea Sprague-Dawley, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (Ciudad de La Habana, Cuba), con un peso corporal entre 300 y 450 g. Se mantuvieron en cajas translúcidas con suministro de agua y alimento *ad libitum*, en un ambiente de humedad ($67 \pm 3\%$) y temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Durante todos los procedimientos experimentales se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales [18].

Procedimiento quirúrgico

El grupo experimental de animales isquémicos incluyó 20 ratas, que fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con 350 mg de hidrato de cloral por kilogramo de peso corporal. Se practicó una incisión en el cuello y se separaron las ACC de los tejidos adyacentes y del nervio vago. A continuación se ligaron con hilo de sutura de seda de 3.0, durante 60 min. Los animales se mantuvieron bajo temperatura controlada de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta la recuperación. Los animales controles ($n = 22$) se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico, solo que no se les realizó la oclusión bilateral de las ACC.

Estudio de las alteraciones del metabolismo oxidativo

Obtención de las áreas cerebrales

Quince días después de la lesión, se anestesiaron los animales con hidrato de cloral (420 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) y se decapitaron. Se extrajeron sus cerebros y se lavaron con NaCl al 0.9% frío y se disecaron el hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza. Para la disección de las áreas cerebrales se tomó como referencia el atlas de Paxinos y Watson [19]. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido, se pesaron y conservaron a -70°C hasta su análisis. Se tomaron muestras de los animales lesionados ($n = 10$) y de los controles ($n = 8$).

Estudio de los indicadores del metabolismo oxidativo

Para el estudio de los parámetros de estrés oxidativo, se homogenizaron las diferentes áreas en solución amortiguadora Tris 1M/ Sucrosa 0.25 M (pH 7.4) con una relación de peso de tejido/volumen de solución amortiguadora de 1/5. Los homogenizados se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se dividió en cuatro alícuotas para el ensayo de la actividad de la SOD y la CAT, la concentración de MDA y de las proteínas totales.

Determinación de la actividad de la SOD

Se utilizó el método de Marklund [20]. Este se basa en la capacidad de la SOD para inhibir la reacción del pirogalol, sustancia que se autooxida y rinde pirogalina, un compuesto amarillo, y anión superóxido, que a su vez es un autocatalizador de la descomposición del pirogalol. Para deslpidar las muestras, se tomaron

4. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 2003;44:85-95.

5. Reinés A, Zárate S, Carmona C, Negri G, Peña C, Rodríguez G. Endobain E, a brain endogenous factor, is present and modulates NMDA receptor in ischemic conditions. *Life Sci* 2005;78:245-52.

6. Al-Majed A, Al-Omar F, Nagi M. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2006;543:40-7.

7. Hartman RE, Lee JM, Zipfel GJ, Wozniak DF. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005;1043:48-56.

8. Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, Kumai Y, Takada J, Ago T *et al*. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation* 2005;111:913-9.

9. Maia FD, Pitombeira BS, Araujo DT, Cunha GM, Viana GS. I-Deprenyl Prevents Lipid Peroxidation and Memory Deficits Produced by Cerebral Ischemia in Rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:87-100.

10. Liverman CS, Cui L, Yong C, Choudhuri R, Klein RM, Welch KMA, *et al*. Response of the brain to oligemia: gene expression, c-Fos, and Nrf2 localization. *Mol Brain Res* 2004;126:57-66.

11. Franklin LR, Girao MH, Leitao PR. Metabolic evaluation of ischemic and reperfusion brain injury following bilateral occlusion of common carotid arteries: an experimental study in rats. *Acta Cir Bras* 2004;19:529-34.

12. Ghoneim A, Abdel-naim A, Khalifa A, El-Denshary ES. Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. *Pharmacol Res* 2002;46:273-9.

13. Heim C, Zhang J, Lan J, Sieklucka M, Kurz T, Riederer P, *et al*. Cerebral oligemia episode triggers free radical formation and late cognitive deficiencies. *Eur J Neurosci* 2000;12:715-25.

14. Benzi G, Moretti A. Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* 1995;19:77-101.

15. Adibhatla RM, Hatcher J. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006;40:376-87.

16. Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res* 2005;30:559-65.

17. Galvão RI, Diógenes JP, Maia GC, Filho AS, Vasconcelos SM, Menezes DB, *et al*. Tenoxicam Exerts a Neuroprotective Action after Cerebral Ischemia in Rats. *Neurochem Res* 2005;30:39-46.

18. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc. 1997; 155-62.

500 µL del homogenado, se les añadieron 150 µL de cloroformo y 250 µL de metanol. Se agitaron vigorosamente y se centrifugaron durante 20 min a 3000 rpm, y se extrajo el sobrenadante. A partir de los 10 s de iniciada la reacción, se leyó la absorbancia a 420 nm durante un minuto, de una mezcla que contenía 900 µL de solución amortiguadora SOD (Tris 0.02 M/HCl 0.2 M, pH 8.2), 50 µL de la muestra deslipidada y 50 µL de la solución de pirogalol (0.2 mg/mL). El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en unidades de actividad enzimática (UAE). Se definió una unidad de SOD como la cantidad de enzima requerida para inhibir la autooxidación del pirogalol en un 50%.

Determinación de la actividad de la CAT

Se determinó la actividad de esta enzima siguiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante espectrofotometría, según Aebi [21]. En el ensayo se utilizó una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.06 M a pH 7.4. Como solución sustrato se empleó H_2O_2 a una concentración de 60 mM en solución amortiguadora de fosfato. En el ensayo se procedió a añadir en la cubeta 650 µL de tampón fosfato, 340 µL de solución sustrato y 35 µL de homogenado, se agitó y se midieron los valores de densidad óptica (DO) a 240 nm cada 5 s durante 20 s. La reacción fue realizada en una celda termostata a 37 °C. Los valores de DO se obtuvieron por duplicado. Se consideró una UAE como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 µmol de H_2O_2 en 1 min a 37 °C.

Determinación de la concentración de MDA

A 100 µL de homogenado se les añadieron 1.5 mL de ácido sulfúrico 0.08 N y 250 µL de ácido fosfotúngstico al 10%, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron nuevamente 1 mL de ácido sulfúrico 0.08 M y 250 µL de ácido fosfotúngstico al 10%, se repitió la centrifugación en iguales condiciones a las anteriores y se desechó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 1.5 mL de agua destilada y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67%, se mezcló y se incubó a 100 °C durante una hora. Posteriormente, a las muestras se les añadieron 2 mL de n-butanol, se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min y se leyó el sobrenadante en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm. La concentración de MDA de cada muestra se determinó por triplicado y se tomó como referencia un patrón de MDA a una concentración conocida. Los resultados se expresaron en nM.

Ensayo de proteínas totales

La concentración de proteínas totales se determinó utilizando el método descrito por Bradford [22]. Mediante agitación se mezclaron 100 µL de muestra con 2 mL de azul brillante de Coomassie 0.1 mg/mL en H_3PO_4 al 8.5%/0.05% de etanol. Se leyó la DO a 595 nm. Para establecer la curva patrón, se utilizaron soluciones de albúmina sérica bovina a concentraciones de 0.045; 0.089; 0.134 y 0.178 mg/mL, determinadas a partir del coeficiente de extinción a 280 nm ($k = 0.68$ mL/mg).

Estudio de las alteraciones conductuales

Aprendizaje y memoria espacial

El laberinto acuático de Morris consiste en la medición del tiempo que demoran los animales en localizar una plataforma transparente de 11 cm de diámetro. La plataforma se ubicó a 1 cm por encima de la superficie del agua (plataforma visible) o sumergida 1 cm por debajo (plataforma oculta), en una piscina circular de 1.5 m de diámetro y una altura del líquido de 40 cm. Para encontrar la plataforma, los animales toman como referencia pistas visuales que rodean al tanque. Se midió el tiempo que tardaron los animales en encontrar la plataforma y escapar del agua (latencia de escape), y se permitió un tiempo máximo de búsqueda de 60 s. Una cámara localizada sobre el centro del tanque permitió la adquisición de los datos correspondientes a los animales controles ($n = 14$) y de los lesionados ($n = 10$).

Evaluación del déficit sensitivo-motor y motivacional

Esta evaluación fue al décimo día de la lesión. Se colocó la plataforma de forma visible en la posición noreste y se realizaron ocho ensayos para cada rata. La búsqueda de la plataforma por las ratas comenzó en cada intento desde una posición de la periferia del tanque seleccionada aleatoriamente entre ocho posibles (este, oeste, norte, sur, noreste, noroeste, sureste y suroeste). Este procedimiento se usó para evaluar las alteraciones sensitivo-motoras y motivacionales que pudieran afectar la evaluación de la memoria y el aprendizaje.

Evaluación de la memoria a largo plazo o de referencia (memoria espacial)

Esta evaluación se realizó a los 11 y 14 días de la lesión e incluyó la localización de la plataforma oculta. La plataforma permaneció en la misma posición a lo largo de toda la prueba. Este estudio incluyó 29 ensayos por cada rata a lo largo de los 4 días de evaluación (8 ensayos cada uno de los tres primeros días y 5 ensayos el último día). El orden de la posición del tanque en que se liberaron las ratas al agua fue diferente cada uno de los días de la evaluación. En el último ensayo del cuarto día, se evaluó la retención. Esta prueba consistió en quitar la plataforma de escape y permitirle a la rata nadar libremente durante 60 s. Se cuantificó el número de veces que la rata pasó por la posición en la cual debía de estar la plataforma (cruces). Nuevamente, a los 30 días de la lesión, se evaluaron la latencia de escape y la adquisición de la retención. Se mantuvo la plataforma en la misma posición, se realizaron 16 ensayos y en el último se evaluó el número de cruces.

Evaluación de la memoria a corto plazo o de trabajo (aprendizaje)

Cuando la oligoemia tuvo un mes de evolución, se evaluó la memoria de referencia. En este esquema se evaluaron los animales durante 3 días, y diariamente se varió la posición de la plataforma que se mantuvo oculta. Se realizaron 12 ensayos por cada rata (cuatro ensayos diarios). Cada día se varió el tiempo esperado

19. Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd. Academic Press; 1986.

20. Marklund J. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pirogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1992; 47:469-74.

21. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol 1984;105:121-6.

22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

entre un ensayo y el siguiente. El tiempo entre los ensayos fue de 20 s, 20 min y 2 h, respectivamente.

Análisis estadístico

La distribución normal de las variables cuantitativas analizadas se determinó mediante la aplicación de la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Los valores se expresaron como la media más/menos el error estándar de la media. Se comparó la actividad de la SOD y de la CAT, así como las concentraciones de MDA, de cada área cerebral, entre el grupo control y el isquémico, mediante una prueba t para muestras independientes. La comparación del número de cruces evaluadas en la prueba del laberinto acuático de Morris, entre los grupos experimentales, también se realizó mediante la prueba t para muestras independientes. La prueba U de Mann-Whitney se empleó para la comparación entre las latencias de cada grupo experimental. La comparación de las latencias de escape cada día, en el mismo grupo experimental, se realizó mediante la prueba de Friedman, seguido de la prueba de Wilcoxon. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

Alteraciones del metabolismo oxidativo

En la tabla 1 se muestran la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de MDA en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado de los animales controles y con oligoemia. Según los resultados, el hipocampo y el cuerpo estriado de los animales lesionados no presentaron alteraciones del metabolismo oxidativo a los 15 días de sufrir oligoemia, a diferencia de la corteza.

En este estudio se observó un aumento significativo de la SOD ($p < 0.05$), como respuesta al evento isquémico en la corteza de los animales sometidos a una reducción del flujo sanguíneo cerebral. La actividad de esta enzima en esta área cerebral aumentó en 10.7% en comparación con el grupo de animales controles. Con relación a la actividad de la CAT, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las áreas estudiadas de los grupos experimentales. Sin embargo, el proceso de oclusión de las ACC indujo un incremento de la actividad de esta enzima en la corteza, que no se manifestó en el resto de las áreas. Por su parte, la concentración de MDA mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la corteza de los animales sometidos al evento isquémico, que alcanzó el 104.4%.

Alteraciones conductuales

En la prueba del laberinto acuático de Morris con la plataforma visible, las ratas sometidas a oligoemia mostraron una conducta similar a la de las ratas controles (Figura 1). No hubo diferencias significativas entre las latencias de escape de ambos grupos experimentales.

Al evaluar la memoria a largo plazo, se observó que tanto las ratas lesionadas como los animales controles mostraron una disminución de la latencia de escape con el transcurso de los días ($p < 0.001$) (Figura 2A). Sin embargo, a pesar de que en ambos grupos de animales esta disminución fue significativa, la meseta de la curva de latencia de los animales oligoémicos fue menos pronunciada que la de los animales controles. Las latencias de escape de los animales con oligoemia se diferenciaron significativamente de la latencia de los animales controles en el tercero y cuarto día de evaluación ($p < 0.01$). Un mes después de la lesión, se mantuvo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre las latencias de escape en ambos grupos experimentales.

El desempeño de ambos grupos de ratas durante el ensayo de retención, no mostró diferencias significativas al cuarto día de evaluación, a pesar de que las ratas isquémicas pasaron menos veces por la posición donde debía de estar la plataforma (Figura 2B). La evaluación de la retención a los 30 días de la lesión, demostró que los animales isquémicos cruzaron el sitio donde debería de estar la plataforma un número de veces significativamente menor que los animales controles ($p < 0.05$) (Figura 2B). La latencia de escape de las ratas sometidas a oligoemia en relación con la latencia de los animales controles fue mayor, y estadísticamente significativa en el segundo día de la evaluación ($p < 0.05$) (Figura 3).

Discusión

En las ratas existe comunicación de la circulación cerebral anterior (carotídea) y la posterior (vertebrobasilar), debido a una estructura anatómica similar al polígono de Willis [2, 11]. La circulación sanguínea del hipocampo proviene de las arterias vertebrobasilares [23] y, en este estudio, no se ligaron estas ramas. De las áreas cerebrales estudiadas, la corteza fue la que mostró alteraciones en el metabolismo oxidativo. Ello se debió a que después de la oclusión de las ACC, la irrigación colateral proveniente de la circulación vertebrobasilar fue suficiente para mantener el flujo sanguíneo del hipocampo y el cuerpo estriado, pero

23. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. Clin Exp Pharmacol Physiol 2003;30:266-72.

Tabla 1. Valores de la media más menos el ESM de la actividad enzimática de la SOD (U/mg de proteína) y la CAT (KU/mg de proteína) y de la concentración de MDA (nmol/L). Los análisis estadísticos confirmaron diferencias significativas (prueba t para muestras independientes), entre el grupo control falso lesionado y el grupo de animales con oclusión bilateral de las ACC

Indicador	Grupo control			Grupo de oligoemia		
	Corteza	Hipocampo	Estriado	Corteza	Hipocampo	Estriado
CAT	58.66 ± 6.81	57.66 ± 13.47	58.21 ± 10.54	74.76 ± 8.75	58.47 ± 13.9	59.13 ± 12.77
SOD	1.68 ± 0.05	1.78 ± 0.05	1.77 ± 0.05	1.86 ± 0.02*	1.75 ± 0.03	1.71 ± 0.08
MDA	9.16 ± 3.38	5.22 ± 2.23	10.37 ± 2.63	18.72 ± 4.60*	2.44 ± 1.46	8.96 ± 1.80

*Grado de significación: $p < 0.05$.

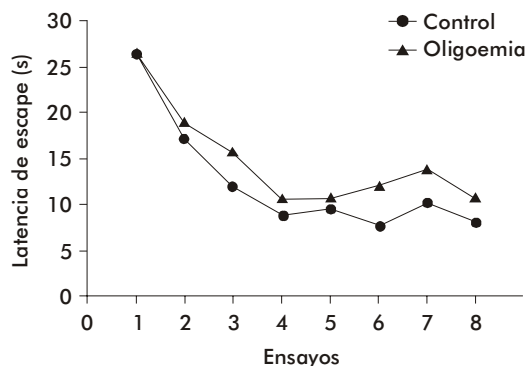


Figura 1. Evaluación del déficit sensitivo-motor y motivacional de ratas con oligoemia y controles. En este esquema la plataforma se mantuvo visible. Los ocho ensayos se realizaron al décimo día de la lesión.

no de la corteza. En un estudio similar, en el que se emplearon ratas con oclusión permanente de las ACC, también se observó una afectación marcada de la corteza y una disminución severa del flujo sanguíneo y de la utilización de glucosa en esta área [23]. Estas alteraciones se mantuvieron hasta una semana después de la oclusión de las ACC.

El aumento de la actividad de la SOD en la corteza de los animales isquémicos, puede considerarse una respuesta a la generación del anión superóxido en elevadas concentraciones. Se conoce que la SOD constituye el principal sistema de defensa contra el exceso de anión superóxido que se forma durante la reperusión [16]. Se ha demostrado que la sobreexpresión de esta enzima protege las neuronas del daño causado por la isquemia-reperusión [24]. Antes se obtuvieron resultados similares [3, 12]. El análisis de estos resultados y los nuestros sugiere que el compor-

24. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH. Overexpression of Copper/Zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the bad cell death signaling pathway. *J Neurosci* 2003;23:1710-8.

25. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E *et al.* Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:4952-7.

26. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 2006;40:388-97.

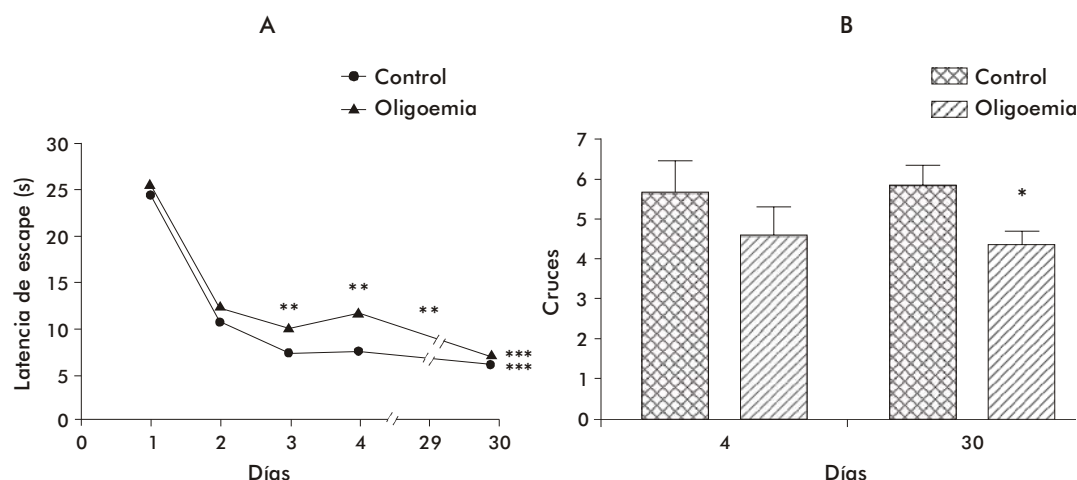


Figura 2. Evaluación de la memoria a largo plazo o de referencia. En este esquema la plataforma se mantuvo oculta y en el mismo lugar. (A) Latencias de escape mostradas por los dos grupos experimentales. (B) Desempeño de los animales en la prueba de adquisición de la retención al cuarto día de evaluación y al mes de efectuada la lesión. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: diferencias entre los dos grupos experimentales. *** $p < 0.001$: diferencias entre las latencias dentro del mismo grupo.

tamiento de la SOD es un indicador importante de la lesión isquémica cerebral en el modelo de oclusión bilateral de las ACC sin hipotensión arterial.

El aumento de la actividad de la CAT en la corteza de los animales lesionados, se correspondió con el aumento de la SOD observado en esta área cerebral. En la reacción catalizada por la SOD se obtiene como producto el H_2O_2 , que en altas concentraciones, activa a la CAT [25]. El exceso de H_2O_2 en presencia de iones metálicos puede dar origen al radical hidroxilo, cuya única vía de eliminación es el continuo recambio celular de las moléculas dañadas, lo que implica que una vez que se forma esta especie, el daño celular es inminente [26].

En un estudio similar en el que se evaluó la actividad de la CAT luego de una hora de oclusión de las ACC y una hora de reperusión [12], la acción de esta enzima no se vio afectada por la oligoemia. Mientras que en nuestro estudio, si bien la actividad de la CAT en la corteza de los animales isquémicos no aumentó de forma significativa, sí hubo un incremento del 27.4%

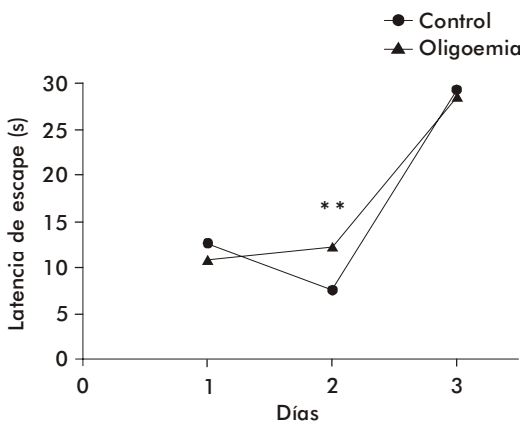


Figura 3. Evaluación de la memoria a corto plazo o de trabajo. En este esquema la plataforma se mantuvo oculta y diariamente se varió la posición. El tiempo interensayo fue de 20 s (día 1), 20 min (día 2) y 2 h (día 3). ** $p < 0.01$.

de su actividad. La diferencia entre estos resultados puede estar dada porque se evaluaron diferentes periodos de evolución de la oligoemia. Se conoce que existe expresión diferencial de las proteínas en diferentes tiempos después de la isquemia [27]. Particularmente se ha demostrado que la actividad de la CAT aumenta después del evento isquémico; sin embargo, se alcanza un pico a las 24 horas de evolución [16].

Es importante destacar que las variaciones en las actividades de la SOD y la CAT pudieran deberse además a una activación regulatoria de su expresión o de su actividad. Se conoce que cuando ocurre un aumento exacerbado del H_2O_2 , que sobrepasa la acción de la CAT, se afecta la expresión de la proteína enzimática y se observan variaciones de su actividad catalítica. Hay evidencias que apoyan la concepción de que el daño oxidativo descansa en mecanismos autoperpetuantes, que duran mucho más que el evento desencadenante [1].

El cerebro tiene una alta composición de ácidos grasos poli-insaturados y de fosfolípidos en comparación con otros órganos; ello, sumado a los altos requerimientos energéticos, gran consumo de oxígeno y elevada concentración tisular de hierro, lo hace particularmente susceptible a la peroxidación lipídica [15]. La determinación del MDA se utiliza como indicador de la peroxidación lipídica, pues la concentración de esta molécula es un exponente directo del daño que provocan las ERO a la célula, específicamente del radical hidróxilo. El aumento de la concentración de MDA en la corteza concuerda con los resultados de Ghoneim y colaboradores [12], quienes observaron un aumento en los niveles de peroxidación lipídica una hora después de la oligoemia, como consecuencia de la re-oxigenación del tejido cerebral.

Quince días después de la oligoemia, continúan generándose los ERO en la corteza de los animales isquémicos, que incrementan la acción antioxidante de la CAT y la SOD, así como la concentración de MDA. Estos hallazgos demuestran la existencia de daño oxidativo intracelular, y sugieren el uso de los parámetros de estrés oxidativo de este estudio como indicadores de la magnitud del daño oxidativo en la lesión isquémica en la corteza.

La prueba conductual del laberinto acuático de Morris es una herramienta útil para el estudio de las bases biológicas del aprendizaje y la memoria. Permite evaluar la capacidad del animal para aprender, recordar e ir a un espacio definido solo por su posición relativa con respecto a referencias visuales extra-laberínticas. Entre sus ventajas, esta prueba es indolora, permite el aprendizaje con rapidez, permite la evaluación del animal antes y después de un tratamiento en repetidas ocasiones, y no brinda pistas olfatorias intra-laberínticas [28].

La evaluación conductual con la plataforma visible permite disociar los elementos cognitivos de los relacionados con los procesos sensoriales, motores y motivacionales. Que las ratas puedan observar la plataforma indica que el escape del animal del agua no depende de su capacidad de aprender y memorizar una posición determinada, sino de su capacidad para ver y nadar [29]. La similitud en el comportamiento de los animales lesionados y los controles, en la prueba con la plataforma visible, afirma que la oclusión bilateral de

las ACC no afectó de manera significativa la capacidad de los animales para nadar, ver y escapar del agua.

La oligoemia indujo una alteración de la memoria de referencia, a pesar de que ambos grupos de animales mostraron capacidad para aprender la localización de la plataforma, lo que se expresa en la disminución significativa ($p < 0.001$) de la latencia de escape a medida que pasaron los días de evaluación. Los animales lesionados tuvieron mayor dificultad para aprender, pues la meseta de su curva de latencia fue menos pronunciada (Figura 2A).

La afectación de la retención que mostraron los animales isquémicos, como consecuencia del evento de oligoemia, después de un mes de evolución pero no a los 14 días de la lesión, lo atribuimos a que en la evaluación de la retención después de un mes de la lesión, los animales necesitaron una mayor demanda de memoria para acertar la posición de la plataforma. En esta ocasión los animales se sometieron a 15 ensayos previos al ensayo de retención; sin embargo, la determinación del número de cruces efectuado a los 13 días de la oligoemia, tuvo lugar después de que los animales habían realizado 28 ensayos con la plataforma en el mismo lugar.

Estos resultados tienen coherencia con los de otros autores en el modelo de oclusión bilateral de las ACC con maniobras de hipotensión [7]. Al evaluar la memoria de referencia, estos investigadores usaron dos esquemas de diferente nivel de complejidad. Cuando usaron el procedimiento de fácil ejecución no observaron diferencias en la memoria a largo plazo entre los animales isquémicos y controles. Sin embargo, al aumentar la demanda de memoria de los animales, mediante el uso de un esquema más complejo, demostraron la afectación de la capacidad de aprender y retener la información de los animales debido a la inducción de un evento isquémico. Los resultados de esta investigación, al igual que los de nuestro grupo de trabajo, manifiestan que con el uso de esquemas conductuales con grados de complejidad elevados, se puede demostrar la presencia de alteraciones conductuales no observables cuando se utilizan esquemas de evaluación que requieren menor demanda del animal.

Los animales sometidos a oligoemia también mostraron una alteración de la memoria a corto plazo o de trabajo. Sin embargo, esta afectación solo fue significativa al segundo día ($p < 0.05$) y superior pero no significativa al tercer día. Este comportamiento puede ser atribuido a que el tiempo esperado entre un ensayo y otro fue diferente para cada uno de estos días. En el segundo y tercer día, el tiempo interensayo fue de 20 minutos y 2 horas, respectivamente; mientras que el primer día fue de solo segundos, por lo que el animal requirió menos tiempo para encontrar la plataforma.

La oclusión bilateral de las ACC induce una reducción del flujo sanguíneo asociado a la corteza en la región temporal-parietal [30, 31]. Se ha demostrado que una hora después de la oclusión de estas arterias, la irrigación sanguínea disminuye en un 50% [30]. Por otra parte, se ha observado que la hipoperfusión cerebral provoca alteraciones en la ultraestructura de los capilares que irrigan el cerebro [32]. Se conoce que los mecanismos involucrados en la formación y conservación de la memoria, incluyen la actividad de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, la esti-

27. Burda J, Hrehorovska M, Bonilla LG, Danielisova V, Cizkova D, Burda R et al. Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Res* 2003;28:1213-9.

28. Giuliani A, Ottani A, Mioni C, Bazzani C, Galantucci M, Minutoli L et al. Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melancortins. *Eur J Pharmacol* 2007;570:57-65.

29. Monteiro SC, Matté C, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse ATS. Vitamins E and C pre-treatment prevents ovariectomy-induced memory deficits in water maze. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:192-9.

30. Butte M, Fortin T, Pappas BA. Pinelectomy: behavioral and neuropathological consequences in a chronic cerebral hypoperfusion model. *Neurobiol Aging* 2002;23:309-17.

31. Fadyukova O, Storozhevskiy T, Vsevolod G, Pinelis V, Koshelev V. Ischemic and hemorrhagic disturbances in cerebral circulation alter contractile responses of the rat middle cerebral artery. *Brain Res* 2004;995:145-9.

32. Wilde MC, Farkas E, Gerrits M, Kilian A, Luiten P. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 2002;947:166-73.

mulación de enzimas como la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina, la activación de factores de transcripción y la inducción de la síntesis de factores neurotróficos. Muchas de las biomoléculas participantes en estos procesos son sensibles a los cambios en el estado redox del medio intracelular [33], por lo que el desbalance oxidativo de las células puede inducir alteraciones conductuales debido al daño de moléculas que participan en los procesos de memoria y de aprendizaje.

A pesar de que no existen reportes relacionados con las alteraciones de la memoria y el aprendizaje en el modelo de oclusión de las ACC sin hipoperfusión cerebral en ratas después de una oligoemia de un mes de evolución, varios estudios en otros modelos de hipoperfusión cerebral, demuestran tales alteraciones [7, 32]. En estas investigaciones se ha constatado una disminución de la capacidad de aprendizaje espacial en los animales lesionados en relación con los animales

controles. Se observó además, un aumento de la latencia de escape y una disminución del porcentaje del tiempo que pasaron los animales lesionados en el área que correspondía con la posición de la plataforma, una vez que esta se les retiró.

Los resultados de nuestro estudio revelaron que en el modelo de oligoemia en ratas sometidas a oclusión bilateral de las ACC, ocurren alteraciones del metabolismo oxidativo en la corteza y se constatan afectaciones de la memoria de referencia y de trabajo. Estas alteraciones conductuales son evidentes, al menos desde los 10 días hasta el mes de evolución de la oligoemia, y pueden ser evaluadas usando esquemas adecuados del laberinto acuático de Morris. De manera que el modelo de hipoperfusión cerebral sin hipotensión inducido en ratas puede ser útil para evaluar la eficacia de estrategias terapéuticas neuro-restaurativas, neuroprotectoras, antioxidantes y que promuevan la recuperación de las funciones cognitivas.

33. González ME, Fernández CI, Bauza JY. Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo. *Biotechnol Apl* 2007;24:145-50.

Recibido en mayo de 2008. Aprobado en enero de 2009.