

Efectos de la ligadura de la arteria carótida común en los valores gasométricos en cobayos (*Cavia porcellus*) (validación del modelo)

Emilio Arch Tirado,* Antonio Verduzco Mendoza,* P Sánchez Aparicio,**** Rigoberto González Piña,*** Juan Licona Bonilla,* Daniel Mota Rojas,¹ María de Lourdes Alonso Spilsbury,¹ Alfonso Alfaro Rodríguez**

Resumen

ANTECEDENTES

La utilización de modelos animales en la investigación científica es fundamental para el estudio y la evolución de la medicina, y ayuda a disminuir el sacrificio indiscriminado de distintas especies. El cobayo es un animal que se usa ampliamente en la investigación científica.

OBJETIVO

Proponer al cobayo como un modelo ideal para la producción de isquemias cerebrales experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 10 cobayos (*Cavia porcellus*) machos de 350 gramos que se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio. Para realizar el procedimiento quirúrgico, se anestesió a los animales con 5 mg/kg de xilazina y 50 mg/kg de ketamina. Mediante una disección a la altura del cuello, se identificó y se procedió a ligar la arteria carótida común izquierda con sutura vicryl 4-0, interrumpiendo la circulación sanguínea de manera ipsilateral.

RESULTADOS

Los hallazgos de esta investigación respaldan la propuesta del uso de cobayos en estudios de daño cerebral inducido. La facilidad del manejo, el reconocimiento de estructuras anatómicas, la madurez al nacimiento, los accesibles procedimientos quirúrgicos y el bajo costo de mantenimiento, ayudan a la explotación del modelo.

CONCLUSIONES

La creciente incidencia de accidentes cerebrovasculares debido a la hipertensión arterial demanda una mayor investigación apoyada por los modelos biomédicos.

* Laboratorio de bioacústica.

** Laboratorio de neuroquímica.

*** Laboratorio de plasticidad cerebral.

Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA.

**** Alumno de la maestría en ciencias, UNAM.

¹ Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Abstract

BACKGROUND

Use of animal models in scientific research is essential to the study and development of the medicine. Animal models approach helps to reduce the indiscriminate slaughter of different species. Guinea pig is widely used in scientific research.

OBJECTIVE

To propose the guinea pig like an ideal model for the production of experimental cerebral ischemia.

MATERIAL AND METHODS

Ten male guinea pigs (*Cavia porcellus*) of 350 g each one maintained under controlled conditions of biotery were used. For surgical procedure, animals were anesthetized with xylazine 5 mg/kg and ketamine 50 mg/kg. By means of a dissection to the height of the neck was identified the common carotid artery left and then it was tied with suture vicryl 4-0, interrupting blood flow ipsilaterally.

RESULTS

This results support the proposal of using guinea pigs in studies of induced cerebral damage. The easy handling of guinea pigs, the recognition of anatomical structures, the maturity at the birth, simple surgical procedures and the first floor maintenance cost help to the exploitation of the pattern.

CONCLUSIONS

The growing incidence of cerebrovascular accidents due to the arterial hypertension demands many studies in this field supported by biomedical models.

Correspondencia: Dr. Emilio Arch Tirado. Laboratorio de bioacústica, Instituto Nacional de Rehabilitación. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI, CP 14080, México, DF. Tel.: 5999-1000 ext. 19312. E-mail earch@inr.gob.mx
Recibido: diciembre, 2007. Aceptado: enero, 2008.

Palabras clave:

Arteria carótida común, isquemia cerebral, gases sanguíneos, modelos biomédicos.

Key words:

Common carotid artery, cerebral ischemia, gasometric blood, animal models.

Introducción

La búsqueda continua de modelos animales para la investigación científica ha sido parte fundamental en el estudio y la evolución de la medicina. Además, ha ayudado a disminuir considerablemente el sacrificio indiscriminado de distintas especies de animales de laboratorio.¹

Arch Tirado y col. propusieron al cobayo como un modelo ideal para acceder quirúrgicamente a la cabeza y el cuello.²

La recuperación funcional en etapas tempranas aunada al enriquecimiento ambiental es esencial para el desarrollo de estudios experimentales en el daño cerebral.³

Se han realizado investigaciones de la ligadura de carótida con la finalidad de evaluar los daños provocados por isquemias experimentales, y se han analizado variables como el peso y el tamaño de la camada,⁴ así como los efectos a largo plazo en ratones neonatos,⁵ correlacionándolos con el sitio de la ligadura.⁶

Asimismo, se demostró que al hiperoxigenar animales a los que se les provocó isquemia experimental por ligadura de carótida, aumentaba el daño en la corteza cerebral.⁷

Se ha reportado la inducción de isquemias en ratones al ligar la arteria renal,⁸ la carótida común y la arteria cerebral media en ratones, por lo que se concluye que la ligadura directa de la carótida es efectiva en el estudio de la isquemia focal permanente.⁹

El lugar de la ligadura, la duración y la región cerebral dañada son variables fundamentales para evaluar la recuperación funcional. Al ligar de manera permanente la arteria cerebral media distal a la fisura rinal por craneotomía frontoparietal en ratas se producen daños persistentes en la corteza frontoparietal, por encima de la fisura rinal.¹⁰ Tamura y colaboradores (1981) efectuaron craneotomías subtemporales en ratas, lo que permitió la oclusión duradera de la arteria cerebral media entre la rama rinal y las arterias laterales del cuerpo estriado, y observaron lesiones infartadas constantes en la corteza frontal e inconsistentes en la corteza sensoriomotora y auditiva en 75% de los casos.¹¹ Mohamed y su grupo (1985), siguiendo el método de Tamura, ligaron permanentemente la arteria cerebral media sin perforar el cigomático, y ocasionaron lesiones en la corteza lateral y el cuerpo estriado.¹² Bederson (1986), por su parte, produjo infartos extensos en la corteza y los ganglios basales al ocluir la misma arteria.¹³ Chen y su grupo la ligaron en la región

superior a la fisura rinal; además, obstruyeron de manera permanente la arteria carótida común, con lo que lograron áreas infartadas en la corteza dorsolateral y frontoparietal lateral en 96%.¹⁴

Osborne (1987) describió una técnica semejante a la de Tamura, pero sin remoción del cigomático, en la que se utilizan métodos de coagulación para la oclusión de la arteria cerebral media con los que se obtienen lesiones en la corteza lateral e inferolateral y en el cuerpo estriado lateral.¹⁵

Asimismo, se ha ocluido la arteria cerebral media en la región proximal a la rama rinal mediante procedimientos fotoquímicos (rosa de bengala y láser de iones de argón) y con diferentes tiempos (1 y 2 horas), para ocasionar infartos en la corteza frontoparietal y dorsolateral, lateral y en el cuerpo estriado central de forma consistente, y en el cuerpo estriado dorsolateral y corteza superior de manera inconsistente.¹⁶

Nakayama y su grupo (1988) se decidieron por un abordaje subtemporal modificado hacia la arteria cerebral media proximal al conducto olfatorio que origina infartos en la corteza frontoparietal y dorsolateral, y en el cuerpo estriado dorsolateral y central.¹⁷ Con métodos fotoquímicos, Prado (1988) provocó trombosis que se extendió del conducto olfatorio hacia la rama rinal distal, e indujo las mismas alteraciones que el abordaje temporal.¹⁸

Brint y su grupo (1988) utilizaron diferentes cepas de ratas (wistar, fischer 344, SHR) en las que ocluyeron la arteria cerebral media al cauterizar la región superior a la fisura rinal de forma ipsilateral, con el fin de generar pequeños infartos.¹⁹

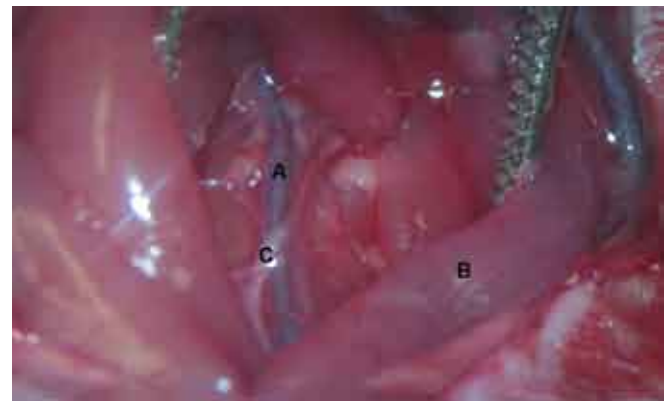


Figura 1. A) arteria carótida común, B) músculo esternohioideo, C) nervio laríngeo recurrente.



Figura 2. Sujeción de la arteria carótida común con una pinza de caimán.

Duverger y MacKenzie (1988) realizaron oclusiones de la arteria cerebral media por el método de coagulación y por craneotomía subtemporal sin dañar el cigomático. Utilizaron las cepas Wistar, Sprague-Dawley, Fischer-344, SHR y SHRSP. Observaron regiones infartadas en forma constante en la corteza inferolateral y lateral, así como infartos corticales extensos (inferolaterales, laterales y dorsolaterales) de manera inconstante en la corteza dorsolateral.^{20,21}

Graham y colaboradores (1989) obstruyeron la arteria cerebral media de ratas a través de craneotomía subtemporal, y posteriormente descubrieron lesiones permanentes en la corteza dorsolateral y el cuerpo estriado.²²

En este trabajo se propone que el cobayo es un modelo ideal para la producción de isquemias cerebrales experimentales.

Métodos

Se eligieron 10 cobayos (*Cavia porcellus*) machos de 350 gramos cada uno. Se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación en cajas de 70 x 50 x 33 centímetros, bajo un periodo de luz-oscuridad de 12 horas, que inició a las ocho de la mañana, y a una temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Se utilizó cama de olote comprimido marca Oloblast®. Se les proporcionó alimento comercial Guinea Pig Diet 5025 a libre demanda, además de agua y vegetales frescos.

Para efectuar el procedimiento quirúrgico, se anestesiaron los animales con 5 mg/kg de hidrocloreto de xilazina y 50 mg/kg de clorhidrato de ketamina, puesto que se ha comprobado que esta combinación produce menos efectos depresivos que otras.²³ La técnica consistió en realizar una incisión sobre la línea media del cuello y diseccionar la piel y el tejido subcutáneo para identificar la arteria carótida común izquierda, que se ubica según su relación anatómica con estructuras adyacentes como el trayecto del nervio laríngeo recurrente y el asta inferior del cartilago tiroides. La arteria

carótida común izquierda se sujeta con una pinza de caimán y se separa de los tejidos aledaños, en especial del nervio laríngeo recurrente; después, se liga con sutura vicryl 4-0, para interrumpir la circulación sanguínea de manera ipsilateral (figuras 1, 2, 3 y 4).

Antes de iniciar la operación, y bajo anestesia general, se obtuvo por vía intracardiaca 1 mL de sangre arterial (ventrículo izquierdo). Al terminar la ligadura de la arteria

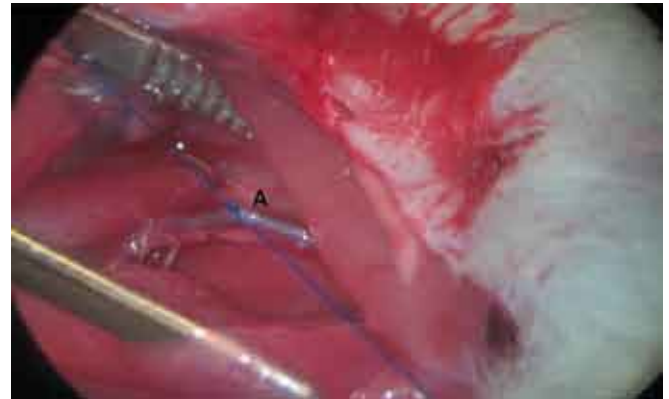


Figura 3. A) ligadura de la arteria carótida común con suturas 4-0.

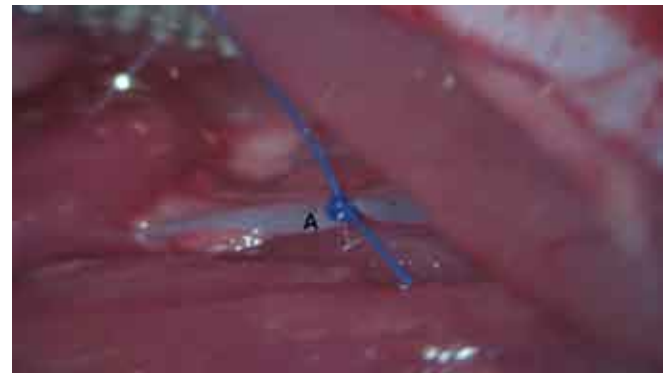


Figura 4. Ampliación de la ligadura de la arteria carótida común.

carótida común izquierda, se tomaron tres muestras más, una a los 15 minutos, otra a los 30 y la última al sacrificar al animal. La punción cardiaca se realizó con jeringas para insulina, las cuales permanecieron colocadas en el ventrículo izquierdo bajo condiciones antisépticas. Para conservar las muestras en forma adecuada se utilizaron micropipetas con anticoagulante (heparina).

Los procedimientos se hicieron bajo protocolo de anestesia y apegados a los lineamientos de la Ley General de Salud de México, al reglamento para el uso y cuidado de los animales de laboratorio y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).^{24,25}

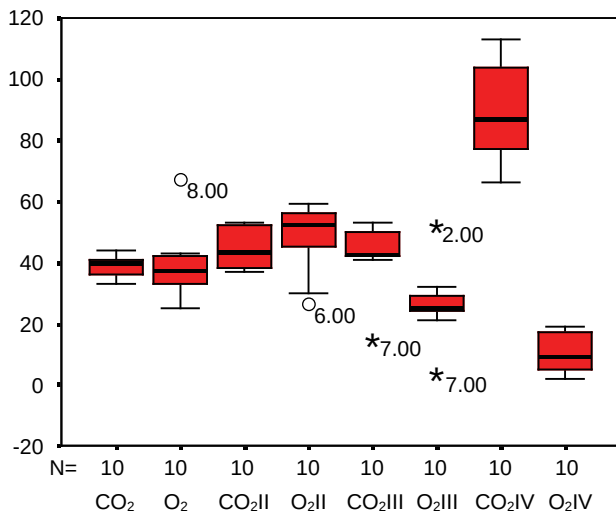


Figura 5. Efectos en el O_2 y CO_2 por la ligadura de carótida. Se observa cómo el O_2 varía con respecto a las condiciones experimentales. Las consecuencias de la anestesia que se notan en el primer registro son producto de la depresión respiratoria; con el tiempo disminuye la concentración de O_2 .

Para el procesamiento de las muestras sanguíneas se utilizó un analizador de gases en sangre GEM Premier 3000, con el que se obtuvieron valores promedio de CO_2 , O_2 , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , glucosa y lactato.

Resultados

Se calcularon la media y la desviación estándar de los resultados del analizador de gases en la sangre. El CO_2 (mmHg) de las muestras fue: 38.9 ± 3.31 en la primera; 44.5 ± 6.51 en la segunda; 42.6 ± 10.68 en la tercera y 88.4 ± 14.76 en la cuarta.

Respecto al O_2 (mmHg), los resultados fueron: primera muestra, 39 ± 11.35 ; segunda, 48.6 ± 11.63 ; tercera, 26.4 ± 11.72 y cuarta, 10.2 ± 5.94 .

Los valores de concentración de glucosa (mg/dL) fueron: 222.5 ± 60.04 en la primera muestra; 360 ± 91.45 en la segunda; 311.3 ± 82.54 en la tercera y 291.3 ± 83.02 en la cuarta.

La concentración de lactato (mg/dL) mostró las siguientes cifras: primera muestra, 1.84 ± 1.31 ; segunda, 0.7 ± 0.22 ; tercera, 0.82 ± 0.48 y cuarta muestra, 4.97 ± 1.73 .

Los resultados indican que al pasar el tiempo de la ligadura (0, 15, 30 minutos) la concentración de O_2 en la sangre disminuyó y aumentó la de CO_2 ; de la misma manera, las cifras de glucosa se incrementaron debido a la falta de oxidación, en tanto que el lactato permaneció constante. Los valores que se obtuvieron después de administrar la anestesia son menores comparados con los posteriores a la ligadura de la arteria carótida, debido a la depresión respiratoria que ocurrió al poco tiempo de recibir anestesia, aunque se recuperaron parcialmente, como se observa en el cuadro y las gráficas en

los registros II (15 minutos posligadura) y III (30 minutos posligadura) (cuadro 1, figuras 5, 6, 7 y 8).

Los valores de Na , K y Ca permanecieron constantes en todas las alteraciones (cuadro 1).

En la exploración física realizada una semana después de la operación, se observó parálisis facial ipsilateral en todos los cobayos sujetos de estudio, sin ningún trastorno motor concomitante.

Los resultados demuestran la sustentabilidad del modelo (0% de mortalidad) para utilizarlo en estudios de isquemia experimental.

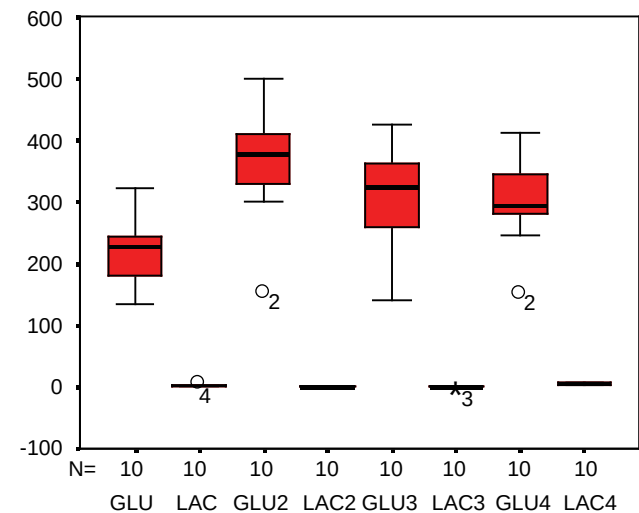


Figura 6. Efectos en la glucosa y el lactato por la ligadura de carótida. Se aprecia cómo las concentraciones de glucosa se reducen debido a la falta de oxidación. En el primer registro la concentración es baja como consecuencia de la acción de la anestesia.

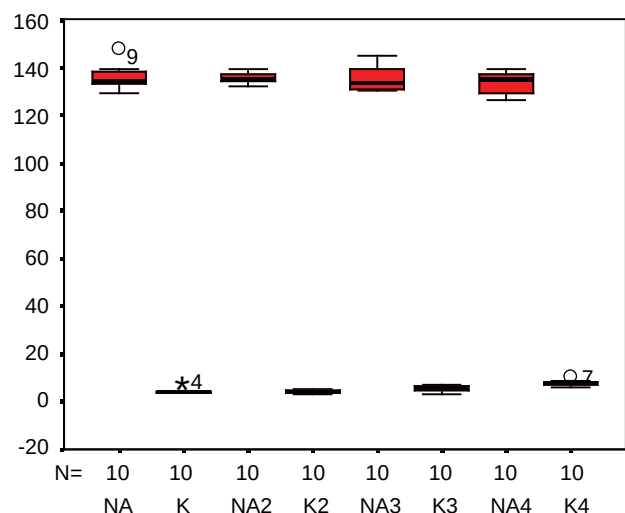
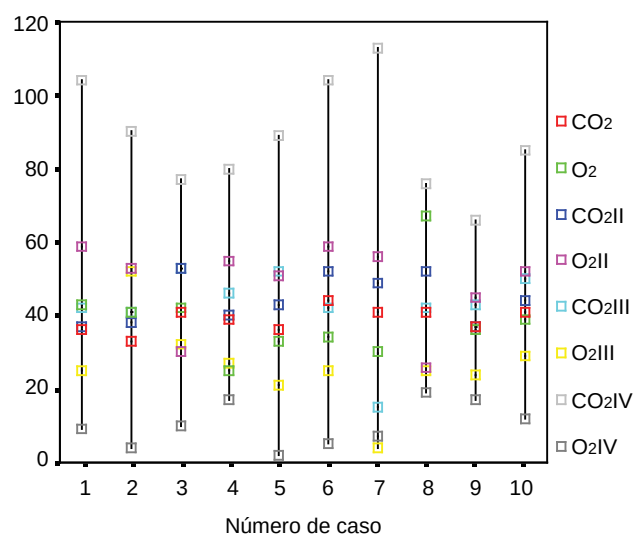


Figura 7. Efectos en el potasio y sodio por la ligadura de carótida. Se observa que la ligadura de la arteria carótida común no influye en las concentraciones de los iones de potasio y sodio.

Cuadro 1. Comparativo de los valores obtenidos antes y después de la cirugía

Medición	Promedio	Desviación estándar
ASL O ₂ (I)	39	11.35
15 min O ₂ (II)	48.6	11.63
30 min O ₂ (III)	26.4	11.73
Post mortem O ₂ (IV)	10.2	5.94
ASL CO ₂ (I)	38.9	3.31
Post mortem CO ₂ (II)	44.5	6.51
30 min CO ₂ (III)	42.6	10.68
15 min CO ₂ (IV)	88.4	14.76
ASL glucosa (I)	222.5	60.04
15 min glucosa (II)	360	91.45
30 min glucosa (III)	311.3	82.54
Post mortem glucosa (IV)	291.3	83.02
ASL lactato (I)	1.84	1.31
15 min lactato (II)	0.7	0.22
30 min lactato (III)	0.82	0.48
Post mortem lactato (IV)	4.97	1.73
ASL Na (I)	135.6	5.05
15 min Na (II)	135.2	2.09
30 min Na (III)	135.1	4.97
Post mortem Na (IV)	133.8	4.58
ASL K (I)	4.53	1.3
15 min K (II)	4.21	0.73
30 min K (III)	5.56	1.38
Post mortem K (IV)	7.81	1.22
ASL Ca (I)	1.28	0.18
15 min Ca (II)	1.29	0.11
30 min Ca (III)	1.06	0.38
Post mortem Ca (IV)	1.29	0.23

ASL: anestesiado sin ligadura.
Los cambios más radicales se observan en el oxígeno y la glucosa. Las demás variables no muestran alteraciones sustanciales.

**Figura 8.** Comparativo por sujeto de estudio durante las condiciones experimentales. Se demuestra que los resultados por sujeto de estudio son uniformes.

Discusión

La finalidad de utilizar modelos biomédicos para la investigación científica es sacarles provecho, dadas sus características anatomofisiológicas, su ciclo de vida, la accesibilidad a diferentes procedimientos invasores, su adaptación al alojamiento y el costo reducido. De acuerdo con lo asentado en la bibliografía, el animal que más se usa para la producción experimental de isquemias es la rata.¹⁵⁻²² En este artículo se propone al cobayo, ya que su tamaño facilita la realización del procedimiento quirúrgico (figuras 1, 2, 3 y 4) al permitir la rápida identificación de las estructuras anatómicas, y su docilidad admite la manipulación y la inducción a la anestesia.

Es un modelo ideal, sobre todo en operaciones de cabeza y cuello,² y en estudios de recuperación funcional, en virtud de la riqueza de sus vocalizaciones,^{26,27} que pueden utilizarse como parámetro fundamental en investigaciones de estas características.

En comparación con los cobayos que emiten señales audibles, las vocalizaciones de las ratas son ultrasónicas, por lo que el investigador no puede validarlas en el momento que se efectúan los registros para relacionarlas con el daño cerebral.

Los resultados obtenidos en el análisis de gases corroboran el daño cerebral, principalmente en el O₂ y la glucosa.

La creciente incidencia de accidentes cerebrovasculares debido a la hipertensión arterial demanda mayores investigaciones en este campo apoyadas por modelos biomédicos.

Conclusiones

Los hallazgos del estudio sustentan la propuesta de la utilización del cobayo en investigaciones de daño cerebral inducido.

Algunos factores que ayudan a la explotación del modelo son: la facilidad de manejo y de realización de los procedimientos quirúrgicos, el reconocimiento de sus estructuras anatómicas, su madurez al nacimiento y el bajo costo de mantenimiento.

Es importante producir y explotar modelos biomédicos que permitan extender la investigación científica en diferentes campos de la medicina.

Referencias

1. Arch Tirado E, Saltijeral Oaxaca J, Zarco Padrón I, Poblano Luna A. El uso y producción de modelos animales en la investigación científica biomédica. *Anim Exp Mex* 1996;1:10-12.
2. Arch Tirado E, Verduzco Mendoza A, Azuara Pliego E, Hernández Orozco F, Collado Corona MA. Utilidad del cobayo como modelo de estudios audiológicos y propuesta de accesos quirúrgicos al oído y cuello. *Cir Ciruj* 2005;73(5):339-44.
3. Puel JL, D'Aldin C, Ruel J, Ladrech S, Pujol R. Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997;117:214-8.
4. Oakden E, Chiswick M, Rothwell N, Loddick S. The influence of litter size on brain damage caused by hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 2002;52:692-6.
5. Ten VS, Wu EX, Tang H, Bradley Moore M, et al. Late measures of brain injury after neonatal hypoxia-ischemia in mice. *Stroke* 2004;35:2183.
6. Myers DL, Liaw L. Improved analysis of the vascular response to arterial ligation using a multivariate approach. *Am J Pathol* 2004;164:43-48.
7. Shimabuku R, Ota A, Pereyra S, Veliz B, et al. Hypoxia with 100% oxygen following hypoxia-ischemia increases brain damage in newborn rats. *Biol Neonate* 2005;88(3):168-71.
8. Morimoto M, Miyamoto S, Mizoguchi A, Kume N, Kita T, Hashimoto N. Mouse model of cerebral aneurysm: experimental induction by renal hypertension and local hemodynamic changes. *Stroke* 2002;33(7):1911-5.
9. Xi GM, Wang HQ, He GH, Huang CF, Wei GY. Evaluation of murine models of permanent focal cerebral ischemia. *Chin Med J (Engl)* 2004;117(3):389-94.
10. Robinson RG, Coyle JT. The differential effect of right versus left hemispheric cerebral infarction on catecholamines and behavior in the rat. *Brain Res* 1980;188:63-78.
11. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981;1:53-60.
12. Mohamed AA, Gotoh O, Graham DI, Osborne KA, et al. Effect of pretreatment with the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 1985;18:705-11.
13. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986;17:472-6.
14. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 1986;17:738-43.
15. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, et al. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50:402-10.
16. Prado R, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD, Busto R. Hyperglycemia increases infarct size in collaterally perfused but not end-arterial vascular territories. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:186-92.
17. Nakayama H, Ginsberg MD, Dietrich WD. (S)-Emopamil, a novel calcium channel blocker and serotonin S2 antagonist, markedly reduces infarct size following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 1988;38:1667-73.
18. Nakayama H, Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD. Photothrombotic occlusion of rat middle cerebral artery: histopathological and hemodynamic sequelae of acute recanalization. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:357-66.
19. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W. Focal brain ischemia in the rat: Methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:474-85.
20. Duverger D, MacKenzie ET. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:449-61.
21. Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI. Recirculation model following MCA occlusion in rats. *J Neurosurg* 1985;63:272-7.
22. Graham DI, Ozyurt E, Park CK, Nehls DG, Teasdale GM, McCulloch J. Protective effects of the NMDA antagonist, MK-801, on focal ischemic brain damage. In: Ginsberg MD, Dietrich WD, ed. *Cerebrovascular diseases. Sixteenth Research (Princeton) Conference*. New York: Raven Press Publishers, 1989;pp:65-72.
23. Schwenke DO, Cragg PA. Comparison of the depressive effects of four anesthetic regimens on ventilatory and cardiovascular variables in the guinea pig. *Comp Med* 2004;54(1):77-85.

24. de Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex* 2002;138(3).
25. http://www.ccac.ca/en/CCAC_Main.htm, 21-VIII-2006.
26. Arch Tirado E, McCowan B, Saltijeral Oaxaca J, Zarco de Coronado I, Licona Bonilla J. Development of isolation-induced vocal behavior in normal hearing and deafened guinea pig infants. *J Speech Lang Hear Res* 2000;43(2):432-40.
27. Arch Tirado E, Collado Corona MA. Análisis de vocalizaciones en cobayos recién nacidos, normoyentes y con sordera provocada en periodos de soledad. *Cir Ciruj* 2002;70:442-8.