

Modelos experimentales de isquemia cerebral

R. Prieto-Arribas^a, A. Moreno-Gutiérrez^a, P. Simal-Hernández^b,
J.M. Pascual-Garvi^c, J. Matías-Guiu^b, J.M. Roda^d, J.A. Barcia-Albacar^a

MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

Resumen. *Objetivo. Revisar los modelos experimentales de isquemia cerebral utilizados en la investigación de la fisiopatología y la terapéutica de esta afección. Se expone de forma clara y sencilla tanto el tipo de lesión cerebral isquémica que cada modelo trata de reproducir como los detalles técnicos específicos para su realización práctica. Desarrollo. Los modelos experimentales de isquemia cerebral han permitido estudiar la fisiopatología de esta enfermedad bajo condiciones controladas por el investigador y analizar los efectos de nuevas estrategias terapéuticas. El conocimiento adquirido con estos modelos ha mejorado el pronóstico de los pacientes que han sufrido un infarto cerebral isquémico tras la introducción de agentes trombolíticos y neuroprotectores. Para que un modelo sea valioso debe ser fiable y fácil de realizar y debe reflejar lo más fielmente posible las condiciones clínicas que trata de imitar. Debe ser reproducible y tener una baja variabilidad entre individuos (animales) y entre investigadores. Los roedores pequeños, particularmente las ratas, son los animales con los que se han desarrollado la mayoría de estos modelos por tener una fisiología y vascularización cerebral similares a la humana. Conclusión. Los modelos experimentales suponen actualmente la mejor herramienta para el estudio de los mecanismos subyacentes al daño cerebral isquémico, aunque su simplicidad impide reproducir de forma exacta la lesión cerebral observada en la práctica clínica. Esta puede ser la causa de la discrepancia en la respuesta terapéutica observada entre los estudios experimentales y los clínicos. [REV NEUROL 2008; 47: 414-26]*

Palabras clave. *Infarto cerebral. Isquemia cerebral focal. Isquemia cerebral global. Modelos experimentales.*

INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral es el proceso fisiopatológico caracterizado por la disfunción de una porción de tejido cerebral secundaria a la disminución del flujo en una arteria cerebral concreta. Se manifiesta por la aparición súbita de déficits neurológicos transitorios o permanentes. La evolución de la isquemia que persiste por debajo de un umbral de flujo conlleva la necrosis del tejido y el desarrollo de un infarto cerebral. En la población adulta de mayor edad la principal causa de los infartos isquémicos es la oclusión aterotrombótica o cardioembólica de una arteria cerebral, mientras que en la población más joven es el vasoespasmio secundario a una hemorragia subaracnoidea. Existe otro grupo de pacientes en los que aparecen síntomas similares pero cuya causa es la rotura intracraneal de una arteria, con la consecuente hemorragia intraparenquimatosa; estas lesiones se denominan ‘infartos hemorrágicos’. Todo este conjunto de enfermedades se agrupa bajo el término ‘patología vascular cerebral’. Según los datos del estudio de Framingham, el 85% de los infartos observados en la práctica clínica son isquémicos y sólo un 15% son infartos hemorrágicos [1]. Según los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística, las enfermedades vasculares cerebrales generan en España entre 120.000 y 130.000 nuevos casos al año y más de la mitad de los pacientes quedan discapacitados o fallecen. Las enfermedades vasculares cerebrales son la primera causa de incapacidad permanente en adultos y la tercera causa de muerte en los países desarrollados. Aproximadamente el 30%

de los pacientes que ha sufrido un infarto cerebral queda con incapacidades graves o permanentes y la mayor parte del resto de los supervivientes presenta dificultades funcionales [1]. Por ello, se trata de una patología con una gran repercusión e importancia social al suponer una carga económica muy elevada. Además, conforme la población envejece, su prevalencia aumenta. Se calcula que en EE. UU. el gasto anual en relación con los pacientes que han sufrido un infarto cerebral es de 42 billones de dólares.

La gran trascendencia social de la isquemia cerebral, junto con la carencia de tratamientos eficaces, a excepción de la trombolisis en las primeras tres horas tras el inicio de los síntomas y del efecto neuroprotector de la citicolina, explican el interés actual por la investigación en este campo. La mejor herramienta de que disponemos hoy por hoy para estudiar la fisiopatología de la isquemia cerebral son los modelos experimentales, [2] que nos permiten abordar de forma simple el estudio de esta afección, que se caracteriza por su heterogeneidad y complejidad. El objetivo de los modelos experimentales es adquirir conocimientos válidos de carácter básico sobre la fisiopatología del daño cerebral isquémico y los efectos de nuevos compuestos capaces de minimizar dicho daño, lo que es de especial interés para su aplicación clínica. El conocimiento de los mecanismos subyacentes al daño cerebral es el paso previo al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y nuevos fármacos que eviten la aparición de lesiones irreversibles. Gracias a la ingente investigación experimental realizada en las últimas décadas, fundamentalmente en roedores, hemos sido capaces de comprender mejor la fisiopatología de la isquemia cerebral humana. Los modelos experimentales también nos permiten estudiar la seguridad y eficacia de nuevos agentes terapéuticos, así como el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico que permitan la detección de tejido potencialmente salvable. Por último, nos han mostrado muchas de las alteraciones celulares que tienen lugar durante la isquemia, así como su perfil temporal [3,4]. Sin embargo, hay muchas cuestiones que siguen sin respuesta.

Aceptado tras revisión externa: 14.05.08.

^a Servicio de Neurocirugía. ^b Servicio de Neurología. Hospital Universitario Clínico San Carlos. ^c Servicio de Neurocirugía. Hospital Universitario La Princesa. ^d Servicio de Neurocirugía. Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

Correspondencia: Dra. Ruth Prieto. Servicio de Neurocirugía. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Profesor Martín Lagos, s/n. Planta 6.^a – Ala Sur. E-28040 Madrid. Fax: +34 913 303 469. E-mail: rprieto@iib.uam.es

© 2008, REVISTA DE NEUROLOGÍA

La isquemia cerebral humana puede manifestarse de diferentes formas dependiendo del tipo, localización y gravedad del déficit circulatorio. Para reproducir esta variabilidad clínica, se han diseñado diferentes tipos de modelos experimentales. Puesto que la aplicabilidad de los hallazgos experimentales a la clínica depende en gran medida de si la fisiopatología del modelo reproduce los rasgos esenciales de la situación clínica, es muy importante la elección del modelo adecuado al objetivo de cada estudio. Con este trabajo pretendemos dar a conocer los diferentes tipos de modelos experimentales de isquemia cerebral que se han desarrollado tanto *in vivo* como *in vitro*. Comenzaremos exponiendo algunos conceptos básicos sobre la isquemia cerebral y los tipos de enfermedades vasculares cerebrales que se observan en la práctica clínica. A continuación, pasaremos a describir los diferentes modelos experimentales, haciendo hincapié en el tipo de daño cerebral que cada uno de ellos reproduce y cuáles son sus ventajas e inconvenientes. Explicaremos más detalladamente los modelos más usados en la investigación actual, con el objetivo de proporcionar los detalles técnicos necesarios para que puedan reproducirse en el laboratorio por los investigadores que centren su estudio sobre el daño cerebral isquémico.

ISQUEMIA CEREBRAL Y TIPOS DE DAÑO ISQUÉMICO EN HUMANOS

La isquemia cerebral consiste en la lesión del parénquima cerebral producido tras un período de falta de aporte de oxígeno y nutrientes. Existen dos tipos básicos de isquemia cerebral: global, que afecta a todo el cerebro, y focal, que afecta a un solo territorio vascular. La isquemia global suele aparecer tras una parada cardíaca, mientras que la isquemia focal surge tras la oclusión de una arteria cerebral. El 65% de los infartos isquémicos que resultan de una oclusión vascular presentan lesiones en el territorio de la arteria cerebral media (ACM), el 15% en el tronco cerebral y el cerebelo, el 9% en el territorio de las arterias cerebrales posteriores, el 2% en el territorio de la arteria cerebral anterior y el resto en regiones limítrofes o múltiples [5]. Puesto que la isquemia en el territorio de la ACM es la principal causa de infarto, la gran mayoría de modelos experimentales de isquemia cerebral focal que se han desarrollado realizan una oclusión de la ACM.

Respecto al tipo más frecuente de isquemia cerebral, la focal, se identifican en el parénquima afectado dos zonas concéntricas: un núcleo central, en el que la integridad tanto estructural como funcional del tejido está gravemente dañada, y una zona periférica, conocida como 'penumbra isquémica', en la que hay una pérdida de función del parénquima cerebral sin daño estructural irreversible y que, por lo tanto, puede ser recuperable. La isquemia secundaria a una 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. Es decir, la intensidad de la lesión estará determinada fundamentalmente por el grado de reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) y por el tiempo que éste se mantenga. Se ha observado que la oclusión temporal de una arteria carótida produce sólo un déficit neurológico transitorio en una minoría de pacientes a los que se realiza esta operación para el tratamiento de aneurismas intracraneales y que dicho déficit desaparece cuando la arteria se repermeabiliza [6]. Sin embargo, no se ha establecido durante cuánto tiempo el tejido cerebral humano debe estar sometido a una reducción del flujo sanguíneo para que se produzcan cam-

bios en la función neurológica o daños estructurales. En primates, se ha observado que la oclusión transitoria de la ACM durante una o dos horas no causa déficits neurológicos o éstos son mínimos, mientras que al mantenerla durante cuatro horas se producen déficits moderados y si la oclusión se prolonga más de seis u ocho horas se observan déficits graves [7].

OBJETIVO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES, EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y ANIMALES EMPLEADOS

Los modelos experimentales tratan de simular una situación experimental similar a las condiciones observadas en la práctica clínica. Permiten investigar la fisiopatología de una enfermedad tan compleja como la isquemia cerebral con un enfoque reduccionista, que facilita el estudio de sus componentes clínicos individuales. Para que un modelo sea útil, además de simular las condiciones de la isquemia cerebral humana y obtener una lesión en el parénquima cerebral similar al infarto cerebral humano, debe ser sencillo de realizar, controlable fisiológicamente y reproducible. Es fundamental que los modelos experimentales tengan una baja variabilidad tanto entre animales como entre distintos investigadores, sobre todo respecto al tamaño y localización de la lesión producida, para que se puedan obtener conclusiones usando el menor número de animales posible. Por otro lado, los modelos animales deben permitir la predicción de los daños histológicos y fisiológicos, así como ofrecer la posibilidad de realizar reperusión tras la fase de isquemia. En general, los principales problemas de todos los modelos de isquemia cerebral son su alta variabilidad y su elevada mortalidad.

Las primeras descripciones de modelos experimentales para ocluir una arteria intracraneal se realizaron mediante craneotomías en perros [8]. Posteriormente se han modificado con el objetivo de minimizar el daño mecánico directo sobre el parénquima cerebral y evitar así la exposición del contenido intracraneal a la atmósfera [9]. Así mismo, se desarrollaron modelos para producir una isquemia cerebral en animales despiertos y modelos en los que la oclusión arterial pudiese ser transitoria. Los primeros trabajos experimentales se desarrollaron en mamíferos grandes, sobre todo perros y gatos; posteriormente, se ha ido teniendo cada vez más a usar modelos con roedores.

Respecto a los animales empleados, su comportamiento, integración motora y sensitiva, el tipo de neocórtex y la vascularización cerebral son factores muy importantes a la hora de elegir un modelo de isquemia. La posición erecta, la presencia de un tentorio dural no óseo y la destreza manual de los primates hacen de ellos los animales más valiosos para el estudio de la isquemia cerebral humana. Sin embargo, la investigación con primates es cada vez más difícil, tanto por razones económicas como éticas, de forma similar a lo que sucede con el uso de otros mamíferos grandes, como gatos y perros. Actualmente, los animales con los que generalmente se prefiere trabajar son los pequeños roedores, especialmente las ratas. Las ratas tienen una anatomía vascular cerebral y una fisiología aceptablemente similares a las de los humanos y son animales de bajo coste, fáciles de criar y manejar, por lo que se han convertido en los animales de experimentación más ampliamente utilizados [10].

En la actualidad, los modelos experimentales más utilizados son los de isquemia cerebral focal en ratas, consistentes en la oclusión de la ACM tanto a la altura de sus ramas corticales [11-13] como en su origen por vía intraluminal [14,15], y los modelos *in vitro* (Tabla).

MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL *IN VIVO*

Los modelos de isquemia cerebral pueden producir una isquemia global, si ésta afecta a todo el cerebro, o focal, si se limita a un solo territorio vascular. También puede diferenciarse entre modelos de isquemia transitoria, si la fase de isquemia va seguida de una fase de reperfusión, o permanente, si sólo se produce isquemia.

Es fundamental conocer la anatomía vascular de los animales que se vayan a emplear. En la mayoría de las especies de mamíferos, incluidas las ratas, hay un polígono de Willis similar al humano en el que existe comunicación entre el sistema carotídeo anterior y el vertebrobasilar posterior. Sin embargo, en algunos tipos de jerbos (*Meriones unguiculatus*) el sistema vertebrobasilar no está comunicado con el carotídeo. La ausencia de arterias comunicantes posteriores hace que esta especie sea susceptible al desarrollo de isquemia hemisférica con la ligadura unilateral de una carótida [16]. Trabajar con jerbos puede ser más difícil que con ratas porque son más pequeños y la monitorización del animal será por ello más difícil. Por otro lado, son animales que tienen un umbral muy bajo para el desarrollo de crisis epilépticas secundarias a la isquemia [17].

MONITORIZACIÓN DE LOS FACTORES QUE MODULAN EL GRADO DE ISQUEMIA CEREBRAL

Varios factores pueden modular la gravedad del daño isquémico. Puesto que el objetivo de los modelos animales es conseguir que la lesión inducida sea reproducible y que haya una mínima variabilidad, se deben monitorizar y controlar estrictamente todas las variables fisiológicas que puedan modificar el efecto de la oclusión del FSC y que, por lo tanto, puedan influir en la lesión tisular final. Las variables que se deben mantener dentro del rango normal a lo largo de todo el experimento son la temperatura, la pre-

Tabla. Modelos experimentales de isquemia cerebral.

		Autor, año	
<i>In vivo</i>			
Modelos de isquemia cerebral global en animales			
Parada cardíaca	Fibrilación ventricular		Hossmann, 1973
	Inyección intracardíaca de cardiopléjicos		Kofler, 2004
	Exanguinación		Behringer, 2000
	Ahogamiento		Makarenko, 1972
	Asfixia		Liachenko, 1998
Interrupción de la circulación cerebral	Interrupción completa de la circulación cerebral	Oclusión 2 vasos jerbos	Levine, 1966
		Oclusión 2 vasos ratas + hipotensión/hipoxia	Eklöf, 1972
		Oclusión 4 vasos ratas	Pulsinelli, 1979 Sugio, 1988
	Interrupción incompleta de la circulación cerebral	Estrangulación cervical	Rabat, 1938
		Decapitación	Hinzen, 1972
		Hipotensión arterial. Estenosis de arterias carótidas comunes o mediante una fistula arteriovenosa	Shibata, 2004 Hai, 2002
		Hipertensión intracraneal	Siesjö, 1970
Modelos de isquemia cerebral focal en animales			
Oclusión de la arteria carótida común	Oclusión de la arteria carótida común en jerbos		Kelly, 2001 Levine, 1966
	Encefalopatía anóxica-isquémica		Levine, 1960
Oclusión de la arteria cerebral media	Oclusión transorbital		Hudgins, 1970 Hossman, 1980
	Oclusión transcraneal	Proximal a cisura rinal	Tamura, 1981
		Distal a cisura rinal	Chen, 1986 Liu, 1989 Bederson, 1986
	Oclusión intraluminal mediante un filamento		Koizumi, 1986 Zea Longa, 1989 Belayev, 1996 Smith-Elsaesser, 1998
	Oclusión intraluminal mediante embolia de coágulo de sangre autólogo o heterólogo		Overgaard, 1992 Overgaard, 1994 Zhang, 1997
Oclusión microvascular de la arteria cerebral media	Oclusión fototrombótica		Watson, 1985
	Agregados plaquetarios		Fieschi, 1975
	Inyección intracerebral de endotelinas (tipos 1 y 3)		Sharkey, 1995 Henshall, 1999
Infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas		Yamori, 1976	
<i>In vitro</i>			
Cultivos primarios neuronales		Goldberg, 1993	
Cultivos organotípicos		Vornow, 1994	
Rodajas de cerebro	Rodajas de hipocampo		Taylor, 1995

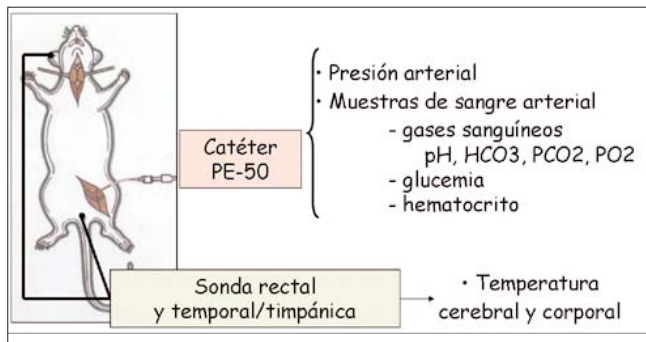


Figura 1. Monitorización de variables que modulan el daño cerebral isquémico. Este esquema muestra las variables fisiológicas que deben monitorizarse en los estudios experimentales de isquemia cerebral. A través de un catéter de polietileno (PE-50) introducido en la arteria femoral se puede monitorizar de forma continua la presión arterial y tomar muestras de sangre, en los tiempos establecidos por el investigador, para analizar los gases sanguíneos (pH, HCO₃, PO₂ y PCO₂), la glucemia arterial y el hematocrito. Además, se debe medir la temperatura corporal mediante una sonda rectal y la temperatura cerebral a través de una sonda colocada entre el músculo temporal y el cerebro, o bien en el conducto auditivo externo a la altura del tímpano.

sión arterial, la glucemia y los gases arteriales (Fig. 1). Por supuesto, todos los animales incluidos en un estudio experimental deben ser del mismo sexo y pertenecer al mismo grupo de edad.

Temperatura

Se ha demostrado que la temperatura tiene un efecto muy significativo sobre el grado de daño cerebral tras la inducción de isquemia. La hipotermia tiene un efecto neuroprotector [18], mientras que la hipertermia agrava el daño al aumentar los requerimientos metabólicos del tejido [19]. Además, puesto que la temperatura cerebral no se puede deducir de la rectal, se recomienda medir tanto la temperatura corporal como la cerebral por separado. Generalmente, la temperatura corporal se mide mediante una sonda rectal, mientras que la temperatura cerebral se puede medir en el músculo temporal (con una sonda colocada bajo el músculo temporal y sobre la región de la ACM) o en el tímpano (con una sonda introducida por el conducto auditivo externo).

Glucemia

La hiperglucemia durante un episodio isquémico puede aumentar el grado de daño cerebral al exacerbar la acidosis tisular, puesto que durante la isquemia la glucosa se metaboliza de forma anaeróbica y da lugar a la acumulación de lactato y a una acidosis láctica [20]. Por otro lado, la hipoglucemia podría también tener un efecto perjudicial, puesto que la glucosa es el principal sustrato energético del cerebro.

Gases arteriales

Las presiones parciales de oxígeno (PaO₂) y dióxido de carbono (PaCO₂), así como el bicarbonato y el pH, se deben monitorizar en todos los estudios de isquemia, puesto que también influyen sobre el tamaño de la lesión. La disminución de la PaO₂ puede tener un gran impacto en la zona de penumbra, de forma que si la sangre está menos oxigenada, el aporte a las células viables es menor y puede acelerarse la necrosis [21]. La PaCO₂ contribuye a aumentar la acidosis tisular. En los modelos de isquemia, la acidosis tisular puede ser un marcador de la lesión, pero también es una de las alteraciones fisiopatológicas causantes de la progresión del daño [3].

Presión arterial

Durante la isquemia cerebral se alteran los mecanismos de autorregulación del FSC, que queda directamente dependiente de la presión de perfusión. Si la presión arterial disminuye, puede peligrar el flujo residual en la zona de penumbra [22]. Generalmente, se opta por una monitorización invasiva canulando la arteria femoral en las ratas con un catéter de polietileno PE-50. Esta vía sirve también para tomar muestras y analizar los gases arteriales.

Respecto al método usado para anestesiarse los animales, lo más importante es que en todos ellos se utilicen los mismos fármacos y las mismas vías de administración. En general, la anestesia puede administrarse por vía inhalatoria, mediante mascarilla facial y con respiración espontánea, o mediante intubación orotraqueal y respiración asistida, o finalmente, por vía intraperitoneal.

MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL

Hay dos modelos básicos de isquemia cerebral global (ICG): mediante parada cardíaca y por la interrupción selectiva de la circulación cerebral (Tabla).

Modelo de ICG mediante parada cardíaca

En este modelo se puede inducir una parada cardíaca bien mediante fibrilación ventricular [23], con la inyección intracardíaca de cloruro potásico u otros agentes cardiopléjicos [24], con la exanguinación del animal [25] o, por último, mediante ahogamiento [26] o asfixia [27]. Hay que tener en cuenta que en estos modelos la duración de la isquemia cerebral es mayor que el tiempo de parada cardíaca porque existe un intervalo variable entre la recuperación de la función cardíaca y el restablecimiento de la circulación cerebral efectiva. Este intervalo dependerá de cómo se haya producido la parada cardíaca. El grado de lesión cerebral que se obtiene con cada uno de estos modelos es diferente. Se ha observado que, cuando la parada cardíaca se produce mediante fibrilación ventricular o por asfixia, el daño cerebral producido es mayor que cuando se usan agentes cardiopléjicos.

Modelo de ICG mediante interrupción selectiva de la circulación cerebral

La interrupción selectiva de la circulación cerebral es un método más adecuado que la inducción de una parada cardíaca, porque el control del investigador es mayor y se reduce la variabilidad entre animales. Sin embargo, en la práctica clínica es muy raro que se produzcan condiciones de ICG que no sean secundarias a una parada cardíaca. Por ello, el uso de estos modelos de isquemia para el estudio de la fisiopatología del daño cerebral por isquemia global puede conducir a conceptos que no sean directamente aplicables a los pacientes en la práctica clínica. La interrupción puede ser completa o incompleta según si la reducción de FSC afecta por igual a todo el cerebro o predomina en las zonas limítrofes entre dos territorios vasculares.

Modelos de ICG mediante interrupción selectiva completa de la circulación cerebral

En estos modelos se debe considerar muy detenidamente la anatomía vascular del animal empleado para evitar que se mantenga un flujo residual colateral en el cerebro. Además, se debe tener en cuenta que el volumen del fluido vascular del animal condiciona directamente la intensidad del edema cerebral subsiguiente.

te a la isquemia. Cuando la isquemia tiene lugar en presencia de un volumen vascular reducido (anemia), el aumento de volumen cerebral o edema es menor que cuando la isquemia se produce en condiciones de incremento del volumen vascular (hiperemia):

- *Oclusión de dos vasos en jerbos*. En jerbos se puede lograr una ICG completa simplemente ligando ambas arterias carótidas, sin necesidad de asociar una oclusión de las arterias vertebrales, porque, como hemos indicado, la mayoría de ellos carece de arterias comunicantes posteriores [28].
- *Oclusión de dos vasos en ratas*. En este caso es necesario asociar una situación de hipotensión o hipoxia a la oclusión bilateral de ambas arterias carótidas comunes en el cuello. La hipotensión arterial (50 mmHg de presión media) puede conseguirse mediante una hemorragia controlada [29] o bien farmacológicamente. Al cabo de un tiempo, establecido por el investigador, se retiran las ligaduras carótidas para restablecer la circulación y se recupera una presión arterial normal. Si la hipotensión arterial se consiguió por exanguinación, es necesario reponer la sangre previamente extraída.
- *Oclusión de cuatro vasos en ratas*. Es el modelo de ICG experimental más utilizado. Consiste en la coagulación de ambas arterias vertebrales, seguida un día después de la oclusión transitoria de ambas arterias carótidas comunes. La primera etapa de coagulación de las arterias vertebrales se puede realizar a través del agujero alar del atlas [30] o, de forma más segura, tras identificar las arterias en las masas laterales de C1 y C2 [31]. Respecto a la segunda fase, se puede hacer con el animal despierto o anestesiado y generalmente se mantiene la oclusión de las carótidas durante 30 minutos.
- *Estrangulación cervical*. La compresión externa de los vasos sanguíneos por estrangulamiento se suele realizar inflando un collarín neumático colocado en torno al cuello del animal. Con estos modelos, hay que tener en cuenta que, además de la obstrucción del flujo arterial, se produce una interrupción del retorno venoso, con una congestión muy importante del cerebro.
- *Decapitación*. Consiste en conectar las cabezas cortadas a un sistema de circulación extracorpórea. Estas preparaciones permiten controlar de forma muy exacta el grado de isquemia que sufre el cerebro ajustando la velocidad y el flujo que se infunde por la bomba [32].

Modelos de ICG mediante interrupción selectiva incompleta de la circulación cerebral

Estos modelos se caracterizan por el hecho de que las áreas que sufren más isquemia son las zonas del parénquima cerebral situadas en el límite entre territorios irrigados por diferentes arterias cerebrales. Esto puede conseguirse bajando la presión arterial por debajo del rango de autorregulación del FSC local o aumentando la presión intracraneal a un valor ligeramente por debajo de la presión arterial. La hipotensión arterial en el sistema cerebral se puede conseguir farmacológicamente, mediante la estenosis bilateral de ambas arterias carótidas comunes [33], o mediante la creación de una fístula arteriovenosa [34]. La hipertensión intracraneal se consigue mediante la infusión de líquidos a gran presión dentro de la cisterna magna para aumentar la presión intracraneal por encima de la presión sanguínea [35].

El principal hallazgo histológico en los cerebros de animales sometidos a un modelo de ICG es la degeneración de las células del hipocampo, principalmente en la capa CA1, por ser la región más susceptible al daño isquémico [36]. Suelen asociarse tam-

bién lesiones en el estriado y el neocórtex que afectan a capas concretas de forma parcheada [30]. La diferencia entre los modelos de oclusión completa e incompleta es que los animales sometidos a una oclusión incompleta presentan daños cerebrales mayores. Esta diferencia se debe a que, en los animales sometidos a una oclusión incompleta, se mantiene el aporte de glucosa y agua al parénquima cerebral y se producen condiciones de glicólisis anaerobia que facilitan un edema cerebral isquémico mayor [37].

MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Los modelos de isquemia cerebral focal (ICF) 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 un infarto isquémico en el territorio de la ACM, puesto que, como hemos señalado, es ahí donde más frecuentemente se localizan los infartos isquémicos en humanos. Hay cuatro modelos básicos de ICF: la oclusión de la arteria carótida común (ACC), la oclusión de la ACM, la oclusión microvascular de la ACM y los infartos espontáneos en una raza de ratas espontáneamente hipertensas (Tabla).

Modelos de ICF mediante oclusión de la ACC *Oclusión de la ACC en jerbos*

En los jerbos y muchas razas de ratones se puede producir ICF mediante la oclusión unilateral de la ACC, ya que carecen de arterias comunicantes posteriores [28]. La cirugía es técnicamente sencilla, pues consiste simplemente en colocar una ligadura alrededor de la ACC. Además, se podrían dejar los extremos de hilo por fuera de la piel y anudarlos con el animal despierto. La gran desventaja de este modelo es su elevada variabilidad, pues el FSC dependerá del grado de apertura funcional de la arteria comunicante anterior. Por ello, es fundamental medir el FSC local o monitorizar la repercusión clínica de la oclusión.

Oclusión de la ACC junto con anoxia *(modelo de encefalopatía anoxicoisquémica de Levine)*

La oclusión de la ACC asociada a hipoxia en ratas produce un daño focal cerebral ipsilateral a la oclusión a pesar de tener el animal un polígono de Willis intacto [38]. Se trata de un modelo también técnicamente sencillo de realizar, pero tiene una variabilidad considerable.

Modelos de ICF mediante oclusión de la ACM

La oclusión en su origen de la ACM produce una isquemia en todo el territorio de esta arteria, incluyendo los ganglios basales, que están irrigados por las arterias lenticuloestriadas. Estas ramas son arterias terminales que, a diferencia de las arterias corticales, no aportan colaterales a los territorios vasculares adyacentes. Sin embargo, la oclusión de la ACM distalmente a las arterias lenticuloestriadas producirá un infarto exclusivamente cortical.

Oclusión transorbital de la ACM

Este modelo se ideó en los años setenta del pasado siglo para producir infartos en primates [9] y posteriormente se modificó para aplicarlo en gatos, perros, conejos e incluso ratas. Es un modelo con múltiples desventajas, ya que se trata de una intervención quirúrgica muy meticulosa y agresiva que requiere la extirpación del globo ocular. Además, puede asociar complica-

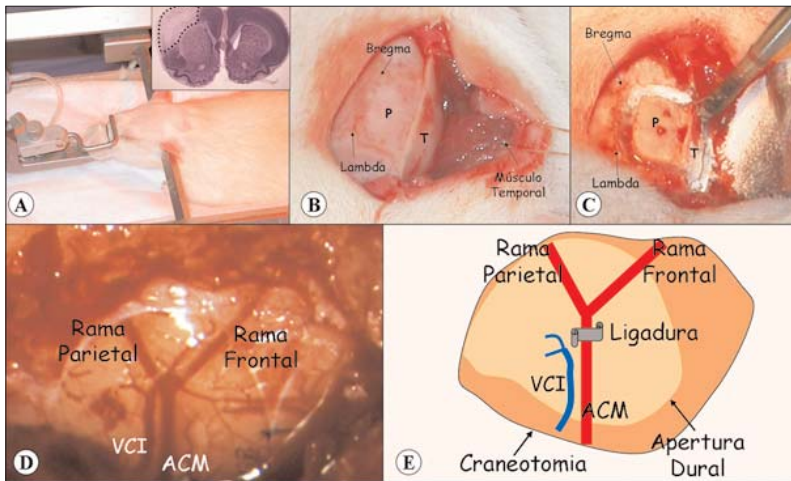


Figura 2. Modelo de infarto cerebral focal mediante ligadura de la arteria cerebral media (ACM) distal a la fisura rinal: a) Con este modelo se obtiene un infarto que afecta exclusivamente a la corteza frontoparietal. Una vez anestesiada, la rata se coloca en un marco estereotáxico para inmovilizar la cabeza. b) Se realiza una incisión en la piel sobre el vértice del animal para exponer el cráneo y el músculo temporal, que se disecciona subperióticamente. c) Se realiza una craneotomía parietotemporal mediante un motor. d) Se observa una imagen vascular cortical en Y, que corresponde a la división de la ACM en las ramas frontal y parietal, junto a la vena cerebral inferior (VCI). Se abre la duramadre a la altura del tronco de la ACM. e) Dibujo esquemático realizado a partir de la imagen anterior para mostrar dónde se coloca el punto de ligadura (nylon 9/0-10/0) de la ACM, inmediatamente proximal a su división en las ramas frontal y parietal bajo el área de duramadre abierta. P: parietal; T: temporal.

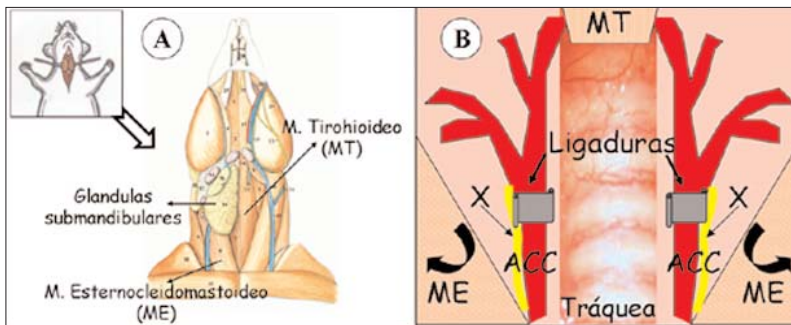


Figura 3. Fase de oclusión de ambas arterias carótidas comunes (ACC): a) La rata se coloca en decúbito supino y se realiza una incisión en la línea media del cuello. Se observan las glándulas submandibulares, los músculos tirohioideos (MT) y los músculos esternocleidomastoideos (ME). b) Los MT se han seccionado en su borde inferior y se han reflejado superiormente, con lo que queda expuesta la tráquea del animal (este paso no es necesario, pero se recomienda en principiantes pues facilita la identificación anatómica), y los ME se separan lateralmente. Una vez expuestas y diseccionadas ambas ACC, se ligan (seda 6/0) proximalmente a su división en carótida externa e interna. La ligadura se mantiene durante 60 minutos. La oclusión también se puede realizar con clips vasculares. X: nervio vago.

ciones relacionadas con la manipulación durante la exposición quirúrgica, tales como vasoespasmos, fístula de líquido cefalorraquídeo y daño cerebral traumático. Su desventaja más importante es que suelen producirse lesiones isquémicas muy variables en su tamaño.

Oclusión transcraneal de la ACM

Consiste en la oclusión de la ACM tras la exposición de la arteria mediante una craneotomía. El tronco principal de la ACM en ratas y ratones se identifica en la superficie cortical, muy cercano a su origen en la arteria carótida interna (ACI). La oclusión se puede realizar proximal o distal a la fisura rinal. Si se hace proximal a la salida de las arterias lenticuloestriadas [11], el infarto es mayor (incluye tanto la corteza como los núcleos caudado y putamen) y la variabilidad entre animales también será

mayor, pues dependerá del tipo de colaterales corticales. Esta técnica requiere realizar una craneotomía muy basal y quitar el hueso cigomático, lo que en estudios a largo plazo puede dificultar la alimentación de los animales y se asocia a una mayor mortalidad.

Debido a estas dificultades técnicas, se prefiere realizar una oclusión de la ACM distal a la fisura rinal justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal [12,13,39]. Una vez colocado el animal en un aparato estereotáxico, se disecciona subperióticamente el músculo temporal (Fig. 2). A continuación se practica una craneotomía a la altura del tronco de la ACM sobre la fisura rinal. Mediante un microscopio quirúrgico se expone la ACM en el área cortical en la que se bifurca en las ramas frontal y parietal, justo junto a la vena cerebral inferior. La duramadre se abre y se liga la arteria con una sutura de monofilamento de nylon 9/0 o 10/0. Una vez ligada la ACM, se confirma visualmente la interrupción del flujo sanguíneo bajo el microscopio quirúrgico. A continuación se realiza una oclusión permanente o transitoria de una o las dos ACC en el cuello (Fig. 3). Se recomienda ocluir ambas ACC durante 60 minutos mediante una ligadura de seda de 6/0 o clips vasculares [40]. El objetivo de esta maniobra es evitar el efecto de la circulación colateral, lo que disminuye el FSC en el territorio de la ACM ocluida y permite que el tamaño del infarto sea más constante [12,13]. Con este modelo de oclusión distal de la ACM se produce un infarto de pequeño tamaño en la corteza frontoparietal, bastante homogéneo en su tamaño [41] y que ocupa aproximadamente un 20% del volumen hemisférico [42]. Otra ventaja de este modelo es que es posible retirar la ligadura alrededor de la ACM para obtener un modelo de reperfusion directa de la zona isquémica [43]. Los principales inconvenientes radican en que se reproduce un infarto cortical de forma no fisiológica mediante la oclusión externa de la arteria y que requiere una gran habilidad quirúrgica para evitar dañar la corteza. Además, es un modelo cruento, al ser necesario realizar una craneotomía. Hay que tener en cuenta que la lesión isquémica obtenida con

este modelo no incluye el lóbulo temporal y, por lo tanto, no se pueden administrar tests que evalúen alteraciones de la memoria.

Oclusión intraluminal de la ACM con un filamento

La principal ventaja de este modelo, diseñado inicialmente por Koizumi [14], es que no es preciso realizar una craneotomía al animal. Es el modelo usado con más frecuencia en los estudios experimentales de isquemia cerebral focal tanto en ratas como en ratones. En las descripciones iniciales del procedimiento, una vez expuesto en el cuello el sistema carotídeo derecho a través de una incisión en la línea media, se introducía una sutura de nylon con la punta engrosada a través de la ACC en el interior de la ACI. Posteriormente se modificó el modelo original ligando la ACC para que el filamento se mantuviera en su sitio y ajustando la punta al tamaño de la rata [44]. Sin embargo, la

oclusión de la ACC puede hacer que se reduzca el flujo en el territorio de las arterias cerebrales anterior (ACA) y posterior, con lo que aumenta la variabilidad del infarto. Por ello recomendamos introducir el filamento en la ACI a través de la arteria carótida externa (ACE) [15,45].

Se coloca en primer lugar una ligadura en la arteria pterigopalatina y a continuación otras dos, una en la ACC y otra en la ACI (Fig. 4). Después se liga y corta la ACE y se introduce el filamento por el extremo cortado de ésta dirigiéndolo hacia la ACI y se le hace avanzar hasta que ocluya el origen de la ACM. Para esto, en ratas macho adultas es necesario avanzar el filamento entre 19 y 21 mm [44]. Una mejora técnica muy interesante es cubrir el segmento final del filamento con silicona [14,46]. Aunque la complejidad del procedimiento aumenta, se evitan las oclusiones incompletas de la ACM [47]. Para preparar el filamento con recubrimiento de silicona, en primer lugar se lijan los 4 mm distales de un monofilamento de nailon 4/0 y se aplica calor en la punta para que se engrose. A continuación se introduce el segmento lijado en un catéter de polietileno PE-10 que se habrá rellenado previamente con silicona biocompatible (Rhodorsil RTV-1556). Tras mantener el catéter de polietileno relleno de silicona con el filamento a una temperatura de unos 45 °C durante 12 horas aproximadamente para que la silicona se endurezca, se extrae el filamento con su recubrimiento de silicona del catéter de polietileno.

El principal inconveniente de este modelo es que la oclusión de la ACM no se hace bajo visión directa y, por ello, es necesario asumir que el hilo ocluye el origen de la ACM en función de la longitud introducida o de la sensación de imposibilidad de seguir avanzando. Sin embargo, unas veces el filamento permanecerá dentro de la ACI, con lo que se obtiene una disminución en el flujo incompleta, y otras entrará en la ACA, lo que aumenta el riesgo de que se produzca una hemorragia subaracnoidea al poder rasgarse dicha arteria [46]. Por ello, recomendamos avanzar el hilo mediante monitorización con láser Doppler del FSC [45, 46]. Se coloca la rata en un marco estereotáxico y se realiza una craneotomía de unos 2,5 mm de diámetro, 5 mm lateral y 3-4 mm posterior con respecto al bregma (Fig. 5). Se coloca la sonda de láser Doppler sobre la duramadre intacta en una zona carente de vasos grandes bajo visión directa con el microscopio quirúrgico. Recomendamos colocar la rata en posición de decúbito lateral con el objetivo de tener acceso tanto a su parte ventral, para introducir el filamento, como a su parte dorsal, para irrigar continuamente la duramadre sobre la que se ha colocado la sonda de láser Doppler. La reducción del FSC es adecuada si es mayor del 70%. Se deben descartar aquellas ratas en las que la reducción del FSC no alcanza esta proporción. Otra posibilidad es evaluar los animales al despertarlos con tests neurológicos [48] y descartar aquellos en los que no se observe un déficit neurológico.

La colocación del filamento en el origen de la ACM produce isquemia en todo el territorio de ésta, incluidos los ganglios

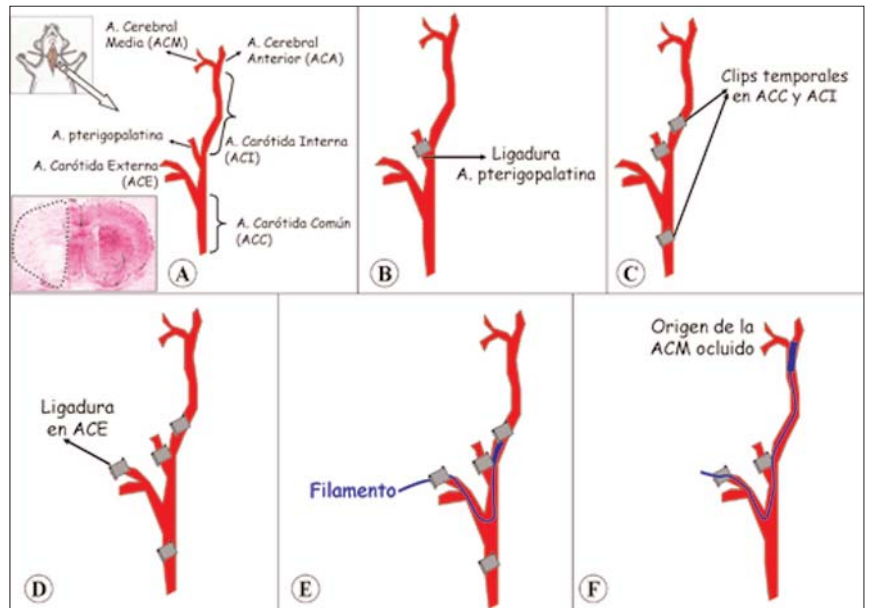


Figura 4. Modelo de infarto cerebral focal mediante la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (ACM) con un filamento: a) Con este modelo se obtiene un infarto que afecta tanto a los ganglios basales como a la corteza frontotemporo-parietal. Una vez colocada la rata en decúbito supino, se expone el sistema carotídeo derecho. La arteria carótida común (ACC) se divide en arteria carótida externa (ACE) e interna (ACI). A diferencia de los humanos, la rata presenta una división proximal de la ACI, la arteria pterigopalatina. Intracranalmente, la ACI se divide en arteria cerebral anterior (ACA) y ACM. b) En primer lugar, se coloca una ligadura (seda 6/0) en la arteria pterigopalatina. c) A continuación se colocan ligaduras o clips temporales en la ACC y la ACI. d) Se liga y corta la ACE. e) Se introduce el filamento (nailon 4/0, con los últimos 4 mm recubiertos de silicona) a través del extremo cortado de la ACE. f) Una vez retiradas las ligaduras que se habían colocado en la ACI y la ACC, se hace avanzar el filamento hasta que ocluya el origen de la ACM.

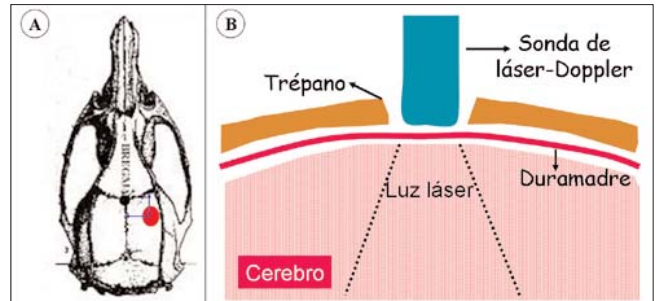


Figura 5. Monitorización del flujo sanguíneo cortical mediante una sonda de láser Doppler: a) Una vez colocada la rata en el marco estereotáxico, se realiza una craneotomía de unos 2,5 mm de diámetro, 5 mm lateral y 3-4 mm posterior con respecto al bregma. b) La sonda de láser Doppler se coloca sobre la duramadre intacta en una zona carente de vasos grandes. Se recomienda irrigar continuamente con suero salino para evitar artefactos en la medición del flujo sanguíneo.

basales. Por lo tanto, con este modelo se obtienen infartos muy grandes que afectan a casi dos tercios (35-40%) del volumen total del hemisferio. Debido al tamaño tan grande del infarto, los animales tendrán déficit neurológicos graves y un edema cerebral muy importante. Se trata de un modelo con una elevada mortalidad en las primeras 24-72 horas tras la inducción del infarto. Puesto que éste afecta a los lóbulos frontal, parietal y temporal, los animales se pueden evaluar con tests de memoria y comportamiento. Dependiendo de si el hilo se retira o no, obtendremos un modelo de isquemia o uno de isquemia-reperusión. Cuando se induce sólo isquemia, la lesión que se obtiene depende del tiempo que se mantenga la oclusión. El tiempo mí-

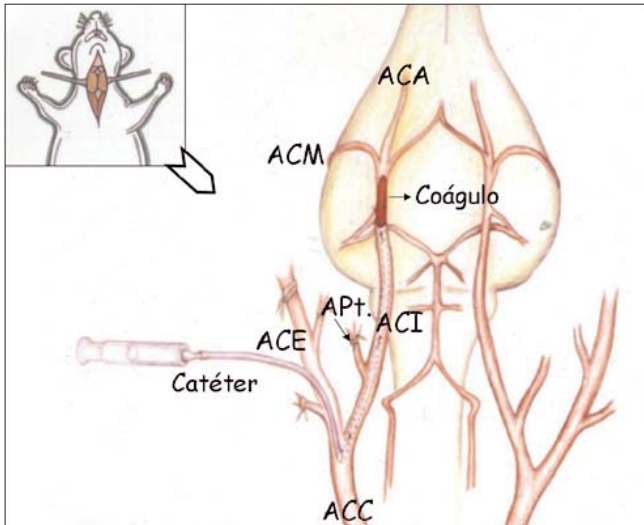


Figura 6. Modelo de infarto cerebral focal de la arteria cerebral media (ACM) mediante embolia con coágulo de sangre: Una vez colocada la rata en decúbito supino, se expone el sistema carotídeo derecho. En primer lugar, se liga la arteria pterigopalatina y, a continuación, se introduce un catéter y se inyecta el coágulo en la arteria carótida externa (ACE). El coágulo será impulsado por el flujo de sangre a través de la arteria carótida interna (ACI) y llegará hasta el origen de la ACM. ACC: arteria carótida común; APt: arteria pterigopalatina; ACA: arteria cerebral anterior.

nimo requerido para que se produzca un infarto depende de cómo se defina la lesión isquémica. Estudios de microscopía óptica y/o electrónica han mostrado que, si el animal se sacrifica tras menos de dos horas de oclusión, las alteraciones histológicas son mínimas y siempre se ve afectada la región supraóptica. Conforme el tiempo de oclusión aumenta, la afectación neuronal se extiende al estriado y, posteriormente, a la corteza, si se mantiene la oclusión más de 12 horas. Si el tiempo es menor de seis horas, se observa festoneamiento, encogimiento y edema del pericarion, junto con vacuolización dendrítica, mientras que si se mantiene más de 12 horas, se observa picnosis nuclear, eosinofilia citoplásmica y cariólisis neuronal. Respecto a la afectación glial, se trata de una respuesta más precoz que la neuronal [49]. Si las ratas se sacrifican tras 24 horas de isquemia, la tinción con 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) está ausente en el área isquémica como resultado de un daño mitocondrial irreversible [50]. Si las ratas se sacrifican con al menos 48-72 horas de isquemia, se observa un área pálida a simple vista en la tinción en relación con la pérdida completa de la hematoxifilia (neuronas y astrocitos fantasmas) [51]. En los modelos de isquemia-reperusión, se ha observado que, con una hora de isquemia temporal, sólo el estriado se daña de forma consistente, mientras que si se someten a 2-3 horas de oclusión, seguida de reperusión, se afecta tanto el estriado como la corteza frontoparietal, pues el área de penumbra se ha transformado en parte del infarto [49,52]. De hecho, el tamaño del infarto que se obtiene con dos o tres horas de isquemia seguida de reperusión es el mismo que en el modelo de isquemia focal permanente [53].

Las razas de ratas que han mostrado mayor reproducibilidad respecto al tamaño de la lesión inducida son las ratas espontáneamente hipertensas [54] y las Long-Evans [45]. Respecto a las ratas hipertensas, la razón de dicha homogeneidad es que presentan menor número de anastomosis vasculares cerebrales y menor reserva de vasodilatación, mientras que en las ratas Long-

Evans no se han observado diferencias anatómicas. Este modelo se asemeja al infarto maligno de la ACM, que supone sólo un 10-20% del total de los infartos, pero que es muy relevante, porque se asocia a una tasa de mortalidad del 80%. Se trata de un modelo con múltiples ventajas. Es técnicamente sencillo, pero lo más importante es que se trata de un modelo muy poco cruento al no ser preciso realizar una craneotomía. Además, se puede usar en ratas y ratones, así como en especies de mayor tamaño. Sin embargo, no está exento de desventajas. La principal es que su reproducibilidad es baja, del 67-74% [46], y con resultados variables dependiendo de la raza de ratas usadas [45] e incluso entre animales de una misma raza pero procedentes de diferentes granjas. Por otro lado, tiene una elevada mortalidad [46], lo que obliga a aumentar el número de animales utilizados en cada estudio. Otra desventaja es que la retirada del filamento no es fisiológica, pues la reperusión es más brusca que con la recanalización espontánea o inducida con tratamientos trombolíticos.

Oclusión intraluminal de la ACM mediante embolia con un coágulo de sangre (autólogo-heterólogo)

Estos modelos son muy interesantes porque son los que mejor pueden simular un infarto isquémico humano de origen embólico. En 1955 se describió el primer modelo para ocasionar una embolia en una arteria intracraneal con coágulos de sangre [55], con un grado de éxito en la inducción del infarto del 80% pero con una gran variabilidad en el tamaño de la lesión. Desde entonces se han aplicado mejoras que han pretendido disminuir la variabilidad en el tamaño del infarto obtenido [56]. La principal aplicación de estos modelos es la investigación de la trombólisis experimental [57]. Según el origen de la sangre que se emplee para obtener los coágulos que se introducen, se diferencia entre modelos heterólogos, si la sangre es de origen humano, y autólogos, si pertenece a la propia rata.

Se trata de modelos complejos porque requieren una preparación muy cuidadosa del coágulo, que debe tener siempre las mismas dimensiones y quedar colocado en el mismo sitio para que se afecte el mismo territorio vascular [58]. Se puede preparar con sangre venosa o arterial, pero hay que tener presente que el contenido de fibrina, alto (coágulo blanco) o bajo (rojo), influirá en la velocidad de la reperusión. El método más fiable para preparar el coágulo es inducir la coagulación de la sangre extraída con trombina dentro de un tubo, para que se formen coágulos cilíndricos con el mismo diámetro. Una vez extraído el coágulo del tubo en el que se ha preparado, se corta en segmentos de la misma longitud. Los coágulos se preparan 24 horas antes de su uso. Se introducen en la ACI a través de un catéter colocado en la ACE, para que el flujo no se interrumpa, y se impulsan por el flujo de la sangre [56] (Fig. 6). El daño dependerá del número y el tamaño de las partículas inyectadas. Una modificación del modelo consiste en la inyección de trombina distal a la ACI o proximal a la ACM para que se forme un coágulo en el sitio de la inyección [59]. Sin embargo, esta variante se ha usado en pocos estudios.

La embolia de la ACM con un coágulo autólogo es un modelo bastante fisiológico. Además, es poco invasivo, al no precisar craneotomía, y permite estudiar el efecto de agentes trombolíticos junto con otras medidas terapéuticas [58]. Sin embargo, tiene varias desventajas. Su principal inconveniente es la elevada variabilidad entre animales y su baja reproducibilidad respecto a las lesiones producidas, además de su laboriosidad técnica. Los coágulos inyectados en la ACI pueden ocluir porcio-

nes distales de la ACM o la ACA. Se recomienda el uso de monitorización del FSC con láser Doppler, así como la valoración con tests neurológicos, para aumentar su reproducibilidad.

Oclusión microvascular de la ACM

Oclusión fototrombótica

Consiste en la inducción fotoquímica de una trombosis intravascular mediante la administración de un contraste fotosensible como el rosa de bengala. Este modelo se ha desarrollado para producir lesiones isquémicas focales corticales [60]. El contraste rosa de bengala se inyecta por vía intravenosa y posteriormente se ilumina en el área cortical escogida con un láser de argón. Como el rosa de bengala es un fotosensibilizante muy potente, la iluminación con láser daña células endoteliales y plaquetas, lo que tiene como resultado una trombosis y coagulación microvascular masiva del tejido expuesto. La oclusión vascular producida por la lesión endotelial y los agregados plaquetarios trata de imitar la fisiopatología de la isquemia cerebral debida a la lesión de pequeños vasos en humanos. Además, la oclusión vascular se puede revertir inyectando nimodipino, lo que permite el estudio del proceso de isquemia-reperusión.

La ventaja de este modelo es que es bastante reproducible, pues causa un infarto cortical bien delimitado, y además es poco invasivo. Sin embargo, su fisiología es muy diferente a la de los infartos isquémicos, ya que en este modelo la zona isquémica se rodea de una franja hiperémica, y no de una zona oliguémica de penumbra isquémica. Al tener una aplicabilidad clínica muy limitada, es un modelo muy poco usado en investigación.

Microembolización de agregados plaquetarios

Estos modelos se han desarrollado para reproducir los ataques isquémicos transitorios. Hay diferentes variantes, como la formación de agregados plaquetarios que se induce con la inyección intracarotídea de difosfato de adenosina o ácido araquidónico [61].

Inyección intracerebral de endotelinas

Consiste en la administración directa de un potente vasoconstrictor, como la endotelina 1 [62] o la endotelina 3 [63]. Ambas causan un fuerte vasoespasmo y, finalmente, la trombosis de las arterias. Es un modelo poco usado porque es muy invasivo, ya que requiere la inyección intracerebral de endotelinas.

Infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas

Hay una raza de ratas espontáneamente hipertensas que son propensas a presentar infartos cerebrales [64]. Las ratas se exponen a una dieta rica en sal desde que tienen seis semanas de vida y suelen presentar infartos de forma consistente a partir de la duodécima semana. Se trata de un mecanismo que se asemeja mucho al que tiene lugar en la clínica humana. Sin embargo, los infartos que aparecen en estos animales, al igual que en humanos, son muy variables en cuanto al momento en que aparecen, su localización y sus características patológicas. Por lo tanto, se han usado más para el estudio anatomofisiológico que para probar estrategias terapéuticas.

MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL *IN VITRO*

El sistema nervioso central de los mamíferos, compuesto por heterogéneos sistemas celulares, requiere estrategias simples de estudio y, aunque los modelos *in vitro* de isquemia cerebral no

pueden reproducir las complejas condiciones funcionales y estructurales del cerebro isquémico *in vivo*, las respuestas que ofrecen pueden ayudarnos. Sus principales ventajas respecto a los modelos animales son que permiten un mayor control de las variables que influyen en la lesión producida y que su coste económico es bajo. Consisten en la incubación de cultivos celulares o rodajas de tejido en medios carentes de oxígeno y/o glucosa para reproducir la interrupción del aporte de oxígeno y nutrientes al parénquima cerebral que sucede durante un episodio isquémico. Si se mantiene la glucosa en una solución de incubación, se está realizando lo que se conoce como experimentos de anoxia (o hipoxia), mientras que si también se omite la glucosa, se denominan experimentos de privación de oxígeno y glucosa. Por lo tanto, no se pueden considerar verdaderos modelos de isquemia cerebral, sino de hipoxia o de privación de oxígeno y glucosa. Hay tres tipos de modelos de isquemia cerebral *in vitro*, según se realicen en cultivos primarios neuronales [65], en cultivos organotípicos [66] o en rodajas de cerebro [67]. A continuación vamos a explicar más detenidamente el modelo *in vitro* con rodajas de hipocampo, uno de los más frecuentemente usados.

Rodajas agudas de hipocampo

Las rodajas de hipocampo se utilizan ampliamente como modelo para estudiar el daño anóxico e isquémico [68]. Los cerebros de las ratas se extraen rápidamente y se introducen en un medio de Krebs-bicarbonato frío (4-6 °C) o solución de disección. Se añade sacarosa para obtener una solución hipertónica y evitar la hinchazón celular. La solución de baño de las rodajas se burbujea durante al menos 45 minutos con 95%O₂/5%CO₂ en las situaciones basales o de reoxigenación con el fin de asegurar la saturación de oxígeno. Para inducir la privación de oxígeno y glucosa, se incuban en un Krebs-bicarbonato, sin glucosa pero con desoxiglucosa, burbujeado con 95%N₂/5%CO₂. Una vez extraídos los cerebros, se disecan los hipocampos rápidamente y, tras colocarlos en un bloque de agar, se sumergen en un medio de Krebs de disección frío y oxigenado. Mediante un vibratomo se preparan secciones transversales del hipocampo con un grosor de entre 150 y 350 μm. A continuación se sumergen las rodajas de hipocampo recién preparadas en un medio oxigenado a temperatura ambiente para que se recuperen del traumatismo asociado a su sección con el vibratomo. En este momento las rodajas de hipocampo están listas para someterlas a períodos de anoxia y/o reoxigenación [69]. Al igual que en los modelos *in vivo*, es fundamental controlar la temperatura a lo largo de todo el experimento, ya que las bajas temperaturas reducen el grado de daño. Con este modelo se tiene un control más estricto de la composición del fluido extracelular, la duración del evento anóxico y la concentración de las moléculas para alcanzar su receptor que en el modelo *in vivo*, y se mantienen intactas la citoarquitectura y las características electrofisiológicas del hipocampo. Se trata de un modelo muy utilizado para realizar estudios de farmacología cuantitativa.

En general, cada vez se tiende a usar más los modelos *in vitro* porque facilitan el estudio de las alteraciones moleculares producidas por la isquemia. Sin embargo, estos modelos tienen importantes desventajas que se deben considerar. En primer lugar, la rodaja de tejido presenta un daño traumático, por las técnicas utilizadas para su preparación, y se incubaba en un medio que es muy diferente del ambiente extracelular normal. Aunque el aporte de oxígeno y glucosa son los principales factores que se pierden en la isquemia cerebral, la sangre contiene muchos otros

factores que en estos modelos también se pierden. Además, se carece del efecto de contenedor rígido que supone el cráneo, por lo que se exagerarán los beneficios asociados a la minimización del edema celular. Finalmente, la mayoría de estas preparaciones se obtienen de animales jóvenes y no de cerebros adultos.

MÉTODOS PARA EVALUAR LA LESIÓN ISQUÉMICA EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE INFARTO CEREBRAL

No podemos terminar esta revisión sin hacer una breve exposición de los principales métodos disponibles para evaluar la lesión isquémica inducida, puesto que la evaluación del potencial beneficio de un agente terapéutico depende de su capacidad para reducir la lesión. En líneas generales, los métodos más importantes de la evaluación del daño isquémico cerebral, son los histopatológicos, bioquímicos y radiológicos.

Valoración histológica del tamaño del infarto

Es la forma clásica de establecer el daño en los modelos de daño cerebral isquémico focal. Las tinciones más utilizadas para delinear el infarto son la hematoxilina-eosina y la tinción de Nissl. El infarto aparece como una región pálida a la tinción, menos teñida que el resto del tejido normal, debido a la vacuolización del neuropilo, lo que incluye edema de la glía y de elementos presinápticos y dendríticos. Ambas se correlacionan aceptablemente con la afectación del metabolismo. Otros métodos para delimitar la lesión permiten discernir la naturaleza de la progresión del daño. La tinción de secciones con TTC colorea de rojo el tejido sano, debido a la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias activas, y define una región en la cual la función mitocondrial se ha visto afectada gravemente. Es fundamental tener en cuenta los tiempos que necesitan las tinciones para hacer visible el área infartada. Mientras que las tinciones de hematoxilina-eosina y Nissl necesitan al menos 48-72 horas de isquemia para identificar la zona del infarto [49], con el TTC, se puede diferenciar el tejido sano del isquémico a las 24 horas de la isquemia [50]. Pero hay que tener en cuenta que, con el TTC, la región delimitada es mayor que el tamaño del infarto definido por hematoxilina-eosina a tiempos cortos. En los estudios en los que se evalúe el efecto de un agente neuroprotector, es más fácil observar su efecto tres o cuatro días tras inducir la isquemia, puesto que lo que idealmente harían dichos fármacos sería detener la progresión del daño y, por lo tanto, habría una zona de pannecrosis menor.

La estereología es una técnica que permite cuantificar el tamaño del infarto de forma muy precisa. Consiste en analizar el número de células supervivientes en una determinada población sin necesidad de aplicar factores de corrección. Es un método muy exacto para valorar el daño tanto en los modelos de isquemia global como focal. En las medidas volumétricas es importante el número de rodajas. Para evitar errores parciales del volumen del infarto, incluso en roedores pequeños es necesario realizar al menos ocho rodajas. En los modelos de isquemia focal, se puede calcular el volumen del infarto con la siguiente fórmula: $%I = 100 - Rn/L$, donde $%I$ es el porcentaje de tejido cortical infartado, Rn es el volumen de corteza normal en el hemisferio infartado, y L , el volumen de corteza presente en el hemisferio contralateral al lesionado [41]. Es fundamental tener en cuenta el artefacto que genera el edema asociado a la lesión isquémica, pues produce una magnificación del volumen

real del tejido infartado. En el momento de edema máximo, puede aumentar el volumen del infarto hasta un 100%. Las medidas reales volumétricas requieren la corrección del edema [51].

Resonancia magnética y espectroscopia

La ventaja de los estudios de resonancia magnética es que podemos estudiar de forma no invasiva la evolución del daño. Además, los estudios pesados en difusión pueden detectar cambios en estadios muy precoces del desarrollo de un infarto e identificar no sólo la lesión sino también las zonas de penumbra isquémica [70]. Se ha observado una buena correlación entre los estudios de imagen y la histología, lo que hace a la resonancia muy útil para evaluar agentes neuroprotectores. Más recientemente, la combinación de imágenes de perfusión de sangre con estudios pesados en difusión ha conducido al concepto de desacomplamiento entre ambos en la zona de penumbra, en la que hay un flujo sanguíneo reducido y ausencia de alteraciones de difusión [71].

Podemos complementar la información imaginológica con el estudio metabólico mediante espectroscopia. Sin embargo, de momento la resolución de los estudios de espectroscopia *in vitro* es muy superior a la de los estudios *in vivo* [72].

Imágenes multimodales sobre secciones de tejido

Tras cortar secciones de parénquima cerebral de un grosor de unos 20 μm , mediante un criostato, se pueden someter a métodos de bioluminiscencia, autorradiografía o fluorescencia. La combinación de estas técnicas ofrece información sobre las alteraciones metabólicas, el flujo sanguíneo y la expresión de proteínas y genes, con una distribución espacial [73]. Permiten identificar la zona de penumbra como aquella en la que no hay correlación entre la caída de ATP y otras alteraciones metabólicas que se desarrollan con flujos sanguíneos mayores (acidosis e inhibición de la síntesis de proteínas).

Análisis subcelular tras microdissección con láser

Esta técnica permite realizar un estudio de las alteraciones bioquímicas en células individuales seleccionadas del tejido que ha sufrido una lesión isquémica [74]. Inicialmente, se seleccionan las células de interés con el microscopio óptico tras colocar el corte histológico de cerebro en una membrana termoplástica. Luego se aplica un pulso láser a dicha membrana que provoca la adhesión de las células elegidas, que quedan englobadas por la matriz termoplástica. Tras retirar la membrana, es posible aislar las células seleccionadas que han quedado adheridas a su superficie. Se pueden realizar estudios de proteínas, ARN o ADN en diferentes tipos celulares y/o localizaciones cerebrales.

Evaluación funcional: tests neurológicos

Se han desarrollado diferentes tests para valorar el impacto motor, sensorial, cognitivo y de comportamiento de la isquemia cerebral en animales de laboratorio. Entre ellos, cabe destacar los que miden la capacidad de mantener la postura en un plano inclinado [75] o de caminar sobre un rodillo [76]. Así mismo, hay escalas combinadas que evalúan las habilidades motoras y sensoriales [48] y tests de función cognitiva y de comportamiento [77]. Sólo algunos de los tests han mostrado una correlación con el tamaño del infarto [70,76], pero la mayoría guardan correlación con el número de neuronas necróticas. El problema de estos tests es que la puntuación obtenida es muy dependiente de la subjetividad del investigador.

LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y DISCREPANCIA EN LOS EFECTOS TERAPÉUTICOS ENTRE ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS

Los modelos experimentales reproducen una situación que no es exactamente igual a la que caracteriza la isquemia en humanos, por lo que los resultados obtenidos en los estudios experimentales deben interpretarse con precaución. La investigación en modelos experimentales ha permitido identificar un gran número de fármacos potencialmente eficaces dirigidos a diferentes dianas de la cascada bioquímica que se desencadena con el daño isquémico. Algunos de los compuestos estudiados en los modelos experimentales no han mostrado eficacia o han tenido muchos efectos secundarios y no han pasado de esta fase de estudio. Sin embargo, la mayoría de los agentes investigados ha mejorado el pronóstico en los animales, pero no ha sido eficaz en los ensayos clínicos, a excepción de los fármacos trombolíticos, cuando se administran en las tres primeras horas tras el inicio de los síntomas, y de la citicolina, un fármaco neuroprotector.

La discrepancia en los resultados obtenidos entre los estudios experimentales y clínicos depende tanto del diseño de los estudios como de los propios fármacos [78]. Existen cuatro razones fundamentales que explican las discrepancias entre los estudios experimentales y los clínicos:

Homogeneidad experimental frente a heterogeneidad clínica

Hay diferencias inevitables relacionadas con el modelo en sí mismo, pues los modelos experimentales tratan de inducir una lesión que presente una baja variabilidad. En los modelos se controlan todas las variables que puedan influir en la extensión de la lesión, como la temperatura, la presión arterial, la glucemia, los gases arteriales, la edad, el sexo y el lugar de la oclusión, mientras que en la práctica clínica las características de cada paciente y del tipo de lesión son únicas. Los animales empleados suelen ser jóvenes y sanos (excepto en el modelo con ratas hipertensas), mientras que en la clínica la isquemia suele afectar a personas mayores y con múltiples enfermedades. Además, algunos anestésicos tienen efecto neuroprotector.

Fisiopatología de la isquemia cerebral animal diferente a la del cerebro humano

Existen diferencias en la neuroanatomía y fisiopatología de la isquemia cerebral de la rata, el animal más utilizado en los modelos experimentales, en comparación con la isquemia inducida en primates [4]. Por ejemplo, es diferente el umbral de FSC por debajo del cual se suspenden ciertas funciones celulares o se produce la muerte celular, así como también varía la cronología del desarrollo del daño celular en la zona de penumbra entre diversos animales, lo que repercute en la ventana terapéutica. El umbral de FSC para causar un daño tisular isquémico es mayor en el cerebro de las ratas, probablemente por el mayor índice metabólico de la corteza cerebral de estos animales. La pérdida de la homeostasis iónica y la despolarización de membrana tienen lugar en los primates cuando el FSC disminuye por debajo de 6-12 mL/100 g/min si la isquemia es transitoria y por debajo de 18 mL/100 g/min si es permanente [79], mientras que en ratas sucede cuando el FSC es menor de 15 mL/100 g/min o 20 mL/100 g/min, respectivamente [4]. Por otro lado, las ratas tienen una circulación colateral muy eficaz que proporciona una defensa natural frente a la isquemia focal y puede facilitar que se observe un beneficio mayor tras la administración de sustancias neuroprotectoras en estos animales [78]. Además, en los estu-

dios experimentales los fármacos neuroprotectores se administran antes de lo que es posible hacerlo en la práctica clínica. Respecto al mecanismo de la lesión, la fisiopatología del infarto espontáneo en humanos es diferente a la inducida experimentalmente. Los modelos que más se asemejan a los mecanismos clínicos son el de infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas y el de oclusión con trombos de sangre, pero ninguno de ellos se emplea asiduamente en los estudios experimentales debido a su elevada variabilidad. Por otro lado, en la mayoría de los modelos experimentales se reproduce un infarto cortical que, por lo tanto, afecta exclusivamente a la sustancia gris, mientras que en la práctica clínica la mayoría de los infartos se localizan en regiones subcorticales (sustancia blanca). La fisiopatología de la isquemia es muy diferente en la sustancia gris y la blanca, así como el efecto de los agentes terapéuticos estudiados.

Propiedades farmacológicas de los agentes terapéuticos, variables en las diferentes especies

Los fármacos pueden tener diferentes propiedades farmacocinéticas en los animales que en el hombre. Además, en la mayoría de los estudios no se trazan las curvas de dosis-respuesta, por lo que se suelen utilizar dosis comparativamente mayores en los animales que en el hombre. También hay que tener presente que en los estudios con animales no se consideran las posibles interacciones farmacológicas, ya que se ensaya cada fármaco de forma aislada, mientras que en la clínica los pacientes suelen estar plurimedcados.

Método empleado para analizar la lesión isquémica

Las técnicas empleadas para evaluar el daño, así como los tiempos en los que se realizan, son diferentes en los estudios experimentales y los clínicos. En los primeros se suelen usar parámetros histológicos o bioquímicos, mientras que los estudios de comportamiento sólo se han comenzado a emplear más recientemente. Sin embargo, en los estudios clínicos se usan escalas de evaluación neurológica y/o mortalidad, y además se analizan en momentos más tardíos tras el infarto.

Pese a las limitaciones intrínsecas de la investigación con modelos experimentales, sigue siendo la mejor herramienta para estudiar la isquemia cerebral y el efecto de los agentes terapéuticos como paso previo a su uso en la clínica. Entre los diferentes fármacos investigados más recientemente, destaca el posible efecto neuroprotector de las estatinas, clásicamente empleadas en la clínica para prevenir la enfermedad cardiovascular por su efecto sobre el metabolismo del colesterol. Recientes estudios experimentales han mostrado que estos fármacos tienen otros mecanismos de acción, como la protección endotelial a través del sistema de la sintetasa del óxido nítrico, así como efectos antioxidantes y antiplaquetarios, que las hacen potencialmente útiles en el daño cerebral isquémico [80].

CONCLUSIONES

Los modelos experimentales son necesarios para seguir aumentando el conocimiento de la fisiopatología de la isquemia cerebral y poder identificar dianas terapéuticas más efectivas. Hay que tener en cuenta que cada modelo tiene sus ventajas y desventajas, y que ninguno por separado reproduce exactamente el comportamiento de un infarto cerebral humano. Los modelos más frecuentemente utilizados en animales son los de isquemia

cerebral focal, por ser los infartos isquémicos el tipo más frecuente de enfermedad vascular cerebral humana. La ligadura de una rama cortical de la ACM mediante una craneotomía, el modelo de oclusión intraluminal y el de oclusión con émbolos autólogos son los más habituales. El primero produce una lesión cortical muy homogénea, pero es cruento, al requerir una craneotomía, y es poco fisiológico. Respecto a los modelos de oclusión intraluminal, el uso de trombos autólogos se asemeja más a la fisiopatología de la embolia cerebral humana, pero la variabilidad en el tamaño de las lesiones es muy elevada. Gene-

ralmente se prefiere el modelo de oclusión intraluminal con un filamento porque la lesión es más reproducible. La oclusión del origen de la ACM ocasiona una lesión isquémica muy extensa que afecta tanto a la corteza como a los ganglios basales.

Cuanto más sencillo es un modelo experimental, más simple es estudiar los procesos fisiopatológicos subyacentes a la patología investigada. Sin embargo, no hay que olvidar las diferencias entre las situaciones experimentales y clínicas, ya que pueden implicar que los resultados obtenidos en los estudios experimentales no sean directamente extrapolables a la condición humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wolf P, D'Agostino R, O'Neal M, Sytkowski P, Kase C, Belanger A, et al. Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke* 1992; 23: 1551-5.
2. Sacco RL, Chong JY, Prabhakaran S, Elkind MSV. Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 2007; 369: 331-41.
3. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia I. Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77: 169-84.
4. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36: 557-65.
5. Bogousslavsky J, van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 1988; 19: 1083-92.
6. Landolt AM, Millikan CH. Pathogenesis of cerebral infarction secondary to mechanical carotid artery occlusion. *Stroke* 1970; 1: 52-62.
7. Crowell RM, Olsson Y, Klatzo I, Ommaya A. Temporary occlusion of the middle cerebral artery in the monkey: clinical and pathological observations. *Stroke* 1970; 1: 439-48.
8. Harvey K, Rasmussen I. Occlusion of the middle cerebral artery. An experimental study. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 1951; 66: 20-9.
9. Hudgins WR, García JH. Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke* 1970; 1: 107-11.
10. Kim HK. Experimental models of cerebral ischemia. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1997; 111: 91-2.
11. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia 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. Chen, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. STA model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 1986; 17: 738-43.
13. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1989; 256: H589-93.
14. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Oneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1-8.
15. Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
16. Levine S, Sohn D. Cerebral ischemics in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* 1969; 87: 315-7.
17. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627-42.
18. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989; 20: 904-10.
19. Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MY, et al. The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 380-9.
20. Warner DS, Todd MM, Dexter F, Ludwig P, McAlister AM. Temporal thresholds for hyperglycemia-augmented ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995; 26: 655-60.
21. Watson JC, Dopperberg EM, Bullock MR, Zauner A, Rice MR, Abraham D, et al. Effects of the allosteric modification of haemoglobin on brain oxygen and infarct size in a feline model of stroke. *Stroke* 1997; 28: 1624-30.
22. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; 26: 627-34.
23. Hossmann V, Hossman KA. Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res* 1973; 12: 423-38.
24. Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods* 2004; 36: 33-44.
25. Behringer W, Prueckner S, Safar P, Radovsky A, Kentner R, Stezoski SW, et al. Rapid induction of mild cerebral hypothermia by cold aortic flush achieves normal recovery in a dog outcome model with 20-minute exanguination cardiac arrest. *Acad Emerg Med* 2000; 7: 1341-2.
26. Makarenko NV. Higher nervous activity in dogs reanimated after long periods of clinical death from drowning and loss of blood. *Zhurnal Vyssei Nervnoi Deiatelnosti Imeni I. P. Pavlova* 1972; 22: 82-8.
27. Liachenko S, Tang P, Hamilton RL, Xu Y. A reproducible model of circulatory arrest and remote resuscitation in rats for NMR investigation. *Stroke* 1998; 29: 1229-38.
28. Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* 1966; 16: 255-62.
29. Eklöf B, Siesjö BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand* 1972; 86: 155-65.
30. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10: 267-72.
31. Sugio K, Horigome N, Sakaguchi T, Goto M. A new model of bilateral hemispheric ischemia-modified four-vessel occlusion in rats. *Stroke* 1988; 19: 922.
32. Hinzen DH, Müller U, Sobotka P, Gebert E, Lang R, Hirsch H. Metabolism and function of dog's brain recovering from longtime ischemia. *Am J Physiol* 1972; 223: 1158-64.
33. Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 2004; 35: 2598-603.
34. Hai J, Ding MX, Guo ZL, Wang BY. A new rat model of chronic cerebral hypoperfusion associated with arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 2002; 97: 1198-202.
35. Siesjö BK, Zvetnow NN. Effects of increased cerebrospinal fluid pressure upon adenine nucleotides and upon lactate and pyruvate in rat brain tissue. *Acta Neurol Scand* 1970; 46: 187-202.
36. Bueters T, Von Euler M, Bendel O, Von Euler G. Degeneration of newly formed A1 neurons following global ischemia in the rat. *Exp Neurol* 2008; 209: 114-24.
37. Rehncrona S, Mela L, Siesjö BK. Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia. *Stroke* 1979; 10: 437-46.
38. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36: 1-17.
39. 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.
40. Roda JM, Carceller F, Díez-Tejedor E, Avendaño C. Reduction of infarct size by intra-arterial nimodipine administered at reperfusion in a rat model of partially reversible brain focal ischemia. *Stroke* 1995; 26: 1888-92.
41. Avendaño C, Roda JM, Carceller F, Díez-Tejedor E. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res* 1995; 672: 83-92.
42. Leker RR, Shohami E, Abramsky O, Ovadia H. Dexanabinol; a novel neuroprotective drug in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurol Sci* 1999; 162: 114-9.
43. Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI. Recirculation model following MCA occlusion in rats. *J Neurosurg* 1985; 63: 272-7.

44. Hata R, Mies G, Wiessner C, Hossman KA. Differential expression of c-fos and hsp 72 mRNA in focal cerebral ischemia of mice. *Neuroreport* 1998; 9: 27-32.
45. Prieto R, Carceller F, Roda JM, Avendaño. The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neurol Res* 2005; 27: 47-52.
46. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 1998; 29: 2162-70.
47. Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1993; 24: 294-7.
48. Borlongan CV, Randall TS, Cahill DW, Sangerg PR. Asymmetrical motor behaviour in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain Res* 1995; 676: 231-4.
49. Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *AJP* 1993; 142: 623-35.
50. Bederson JA, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17: 1304-8.
51. Swanson RA, Morton MT, Tsao WG, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10: 290-3.
52. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao WZ, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture, neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996; 27: 1616-22.
53. Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1992; 23: 552-9.
54. Coyle P, Jokelainen PT. Differential outcome to middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHRSP) and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Stroke* 1983; 14: 605-11.
55. Hill NC, Millikan CH, Wakim KG, Sayre GP. Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot. Preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1955; 30: 625-33.
56. Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Hoyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 484-90.
57. Overgaard K. Thrombolytic therapy in experimental embolic stroke. *Cereb Brain Metab Rev* 1994; 6: 257-86.
58. Busch E, Kruger K, Hossman KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 1997; 778: 16-24.
59. Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 123-35.
60. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 1985; 17: 497-504.
61. Fiseschi C, Battistini N, Volante F, Zanette E, Weber G, Passero S. Animal model of TIA: an experimental study with intracarotid ADP infusion in rabbits. *Stroke* 1975; 6: 617-21.
62. Sharkey J, Butcher SP. Characterization of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 1995; 60: 125-31.
63. Henshall DC, Butcher SP, Sharkey J. A rat model of endothelin-3-induced middle cerebral artery occlusion with controlled reperfusion. *Brain Res* 1999; 843: 105-11.
64. Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 1976; 7: 46-53.
65. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993; 13: 3510-24.
66. Vornow JJ, Tasker RC, Coyle JT. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* 1994; 25: 457-64.
67. Whittingham TS, Lust DW, Passonneau JV. An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. *J Neurosci* 1984; 4: 793-802.
68. Taylor CP, Burke SP, Weber ML. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J Neurosci Methods* 1995; 59: 121-8.
69. Sobrado M, Roda JM, López MG, Egea J, García AG. Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett* 2004; 365: 132-6.
70. Li F, Han S, Tatlisumak T, Carano RAD, Irie K, Sotak CH, et al. A new method to improve in bore middle cerebral artery occlusion in rats. Demonstration with diffusion and perfusion-weighted imaging. *Stroke* 1998; 9: 715-9.
71. Neumann-Haefelin T, Wittsack HJ, Wensker F, Siebler M, Seitz RJ, Mödder U, et al. Diffusion- and perfusion-weighted MRI. The DWI/PWI mismatch region in acute stroke. *Stroke* 1999; 30: 1591-7.
72. Pascual JM, Carceller F, Roda JM, Cerdán S. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998; 29: 1048-57.
73. Hossman KA. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2007; 23.
74. Cuadrado E, Rosel A, Álvarez-Sabin J, Montaner J. Captura tras microdissección con láser: una nueva herramienta para el estudio de la isquemia cerebral. *Rev Neurol* 2007; 44: 551-5.
75. Yonemori F, Yamaguchi T, Yamada H, Tamura A. Evaluation of a motor deficit after chronic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1099-106.
76. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke* 1997; 28: 2060-5.
77. Wahl F, Allix M, Plotikne M, Boulu RG. Neurological and behavioural outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1992; 23: 267-72.
78. Alonso de Leciana MA, Díez-Tejedor E, Gutiérrez M, Guerrero S, Carceller F, Roda JM. The experimental approach –harmonizing science with practice. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20 (Suppl 2): 159-68.
79. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, FitzGibbon SJ, DeGirolami U, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 1981; 54: 773-82.
80. Tapia-Pérez H, Sánchez-Aguilar M, Torres-Corzo J, Rodríguez-Leyva I, Herrera-González LB. Estatinas y mecanismos de protección cerebral. *Rev Neurol* 2007; 45: 359-64.

EXPERIMENTAL MODELS OF CEREBRAL ISCHEMIA

Summary. Aim. To provide a summary of the different experimental models of cerebral ischemia designed both under in vivo and in vitro conditions. A clear and concise description of the specific types of brain lesion reproduced by each model is given together with the most frequent technical troubles associated. Development. Experimental models of cerebral ischemia have contributed substantially to the understanding of the physiopathology of the ischemic brain injury and to test the beneficial effects of new therapies. Outcome of patients suffering from an ischemic stroke has improved considerably with the use of these models, particularly after the introduction of thrombolytic and neuroprotective drugs. Experimental models allow the study of the evolving ischemic brain injury under strict and controlled conditions. Usefulness of experimental models is limited by their reliability, simplicity and reproducibility among different researchers. Small rodents, especially rats, have been the preferred animals used to develop models of cerebral ischemic injury, due to their cerebral physiology and vascularisation which is closer to the human. Conclusion. The use of experimental models of cerebral ischemia constitutes the most suitable tool to investigate the physiopathology of this type of injury. However their simplicity prevents an exact reproduction of the cerebral damage observed in clinical settings. This could be the main reason for the discrepancies observed between the therapeutic effect in the experimental and clinical studies. [REV NEUROL 2008; 47: 414-26]

Key words. Brain infarct. Experimental models. Focal cerebral ischemia. Global cerebral ischemia. Stroke.