



Ozono y neuroprotección: dos modelos animales.

Jorge Daniel García Salman*, Rosa María Coro Antich*, Yuneidys Mengana Tamos*, Héctor Pérez Saad*

* Instituto de Neurología y Neurocirugía CUBA

Resumen

Introducción: Los agentes neuroprotectores deben impedir el desarrollo de insultos cerebrales o ayudar a disminuir las secuelas sensitivas, motoras y cognitivas después de producido el ictus. Dada la conocida inocuidad del ozono por vía rectal, éste ya se ha empleado en pacientes, aunque de manera muy limitada. **Objetivos:** El propósito de este trabajo ha sido estudiar los efectos neuroprotectores del ozono en dos modelos animales de isquemia cerebral, y analizar los posibles mecanismos de acción de este agente. **Métodos:** Se utilizó el gérbil de Mongolia, roedor muy acertado para los modelos de isquemia cerebral por presentar el polígono de Willis incompleto. Los modelos de isquemia fueron: isquemia unilateral permanente e isquemia bilateral transitoria. Se evaluó el estado clínico de los animales, la conducta (a través de la actividad exploratoria espontánea), y la sobrevivencia de las neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo, que son las más sensibles a la isquemia. **Resultados:** El ozono administrado como pre-tratamiento antes de provocar isquemia unilateral permanente no afectó el estado clínico de los animales, mejoró la capacidad de recuperación cognitiva, y protegió las neuronas del sector CA1 del hipocampo. Cuando se administró el ozono como tratamiento posterior a la isquemia bilateral transitoria demostró un efecto neuroprotector sobre la disfunción cognitiva.

Introducción

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) constituyen la tercera causa de muerte en Cuba y la primera causa de discapacidad(1). Entre ellas, la enfermedad cerebrovascular isquémica es la de mayor incidencia y prevalencia epidemiológica dentro y fuera de nuestro país.

Las investigaciones actuales en la temática de las enfermedades cerebrovasculares siguen dos direcciones fundamentales: una dirigida al conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades y otra que se orienta al desarrollo de agentes y procedimientos terapéuticos para disminuir los índices de mortalidad y de discapacidad(2). Una de las líneas de investigación del Departamento de Neurología Experimental del Instituto de Neurología y Neurocirugía es la búsqueda de agentes neuroprotectores, entre los cuales está el ozono. La estrategia se basa en el empleo de agentes terapéuticos de acción inespecífica en modelos experimentales de isquemia cerebral, cuyos resultados sirvan para ulteriores ensayos clínicos(3).

La conocida inocuidad del ozono administrado por insuflación rectal(4) ha dado lugar a que se realizaran aplicaciones terapéuticas en pacientes aún sin estar completamente documentados los mecanismos de acción a través de experimentos en modelos animales. Se ha evidenciado el papel del ozono en la elevación de la capacidad de respuesta celular al estrés oxidativo y a la degeneración inducida por diversos agentes, así como en la potenciación de los procesos regenerativos(5).

El gérbil de Mongolia, *Meriones unguiculatus*, es un roedor adecuado para estudiar las enfermedades cerebrovasculares(6) por contar con un polígono de Willis incompleto, lo que garantiza una cierta independencia entre la circulación carotídea y la vertebrobasilar. Esto constituye una gran ventaja a la hora de inducir un ataque isquémico de forma experimental porque estos animales desarrollan isquemia en un hemisferio cuando se les ocluye la respectiva carótida, y en todo el cerebro anterior cuando se ocluyen ambas carótidas(7).

Los índices empleados para medir la eficacia terapéutica de los neuroprotectores en modelos experimentales son la valoración del estado clínico del animal, la sobrevivencia neuronal en el sector CA1 del hipocampo (donde están las neuronas más sensibles a la isquemia) y la evaluación de la conducta exploratoria(8).

El propósito de este trabajo ha sido estudiar los posibles efectos neuroprotectores del

ozono en dos modelos animales de isquemia cerebral:

- 1- Isquemia unilateral permanente: Estudiar la efectividad del pre-tratamiento con ozono por vía rectal en el gérbil de Mongolia.
- 2- Isquemia bilateral transitoria: Estudiar la efectividad del pos-tratamiento con ozono por vía rectal en el gérbil de Mongolia.

Material y Métodos

Se utilizaron gérbiles de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) con peso alrededor de 60g. Se mantuvieron con agua y alimentación *ad libitum*, exceptuando el día de la operación. Los estudios se realizaron de acuerdo con las normas establecidas en las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio (9, 10). Los modelos de isquemia cerebral evaluados fueron isquemia unilateral permanente e isquemia bilateral transitoria.

Modelo de Isquemia unilateral permanente (IUP)

Se utilizaron 82 animales: 19 controles (7 sacrificados a las 24 horas), 31 tratados con ozono (8 sacrificados a las 24 horas) y 32 tratados con oxígeno (9 sacrificados a las 24 horas). El resto de los animales se sacrificó a los 7 días. Los animales se anestesiaron con una mezcla de halotano, óxido nitroso y oxígeno. Mediante un abordaje cervical ventral se aisló la carótida con un derecha. La arteria se ligó en dos puntos con sutura 4-0 y posteriormente se seccionó entre estos. A los animales del grupo control se les aisló la carótida sin ligarla ni seccionarla. Los animales tratados recibieron 1mL/Kg de ozono u oxígeno (éste último es el vehículo) por insuflación rectal durante 3 semanas (15 sesiones) antes de la operación. Se sacrificaron 24 animales a las 24 horas de la operación y el resto se sacrificó a los 7 días. Las variables se computaron **24 horas** y **7 días** después de la operación.

Modelo de Isquemia bilateral transitoria (IBT)

Se utilizaron 28 animales: 8 controles, 10 tratados con ozono y 10 tratados con oxígeno (iguales volúmenes que el modelo de IUP). Todos los animales se sacrificaron a los 7 días de la operación. Los animales se anestesiaron (igual que en el modelo anterior), se aislaron las carótidas comunes, y se ocluyeron durante 10 minutos. A los controles solamente se les aislaron las carótidas y se suturaron. Las operaciones se realizaron a 37°C empleando un equipo de regulación de temperatura. Los animales de los grupos tratados recibieron 5 sesiones de 1mL/Kg de ozono u oxígeno por insuflación rectal después de la operación. Las variables se computaron un día **antes** y 7 días **después** de la operación.

Evaluación conductual

A las 24 horas se registró la cantidad animales muertos y la cantidad que presentaban o no signos clínicos de infarto (en el modelo de IUP).

Se estudió la actividad exploratoria espontánea en un recipiente cilíndrico de 31 cm de diámetro y 25 cm de altura (prueba de open field). Esta prueba se realizó el día anterior a la operación y el día del sacrificio. Se contaron los empinamientos sobre las patas traseras (conducta característica de los roedores para explorar un ambiente nuevo) durante 9 minutos.

Se calculó la proporción de empinamientos en cada periodo de tres minutos para cada animal. Se determinó la recta de mejor ajuste para los tres puntos, a la que se llamó **curva de habituación**. Los valores absolutos de las pendientes de esas rectas representan la capacidad de habituación.

Las variables conductuales medidas fueron:

Signos clínicos (SC): Es la evidencia que muestra el animal de que ha desarrollado infarto cerebral.

Número total de empinamientos (NTE): Es la cantidad de empinamientos realizados por los animales en el total del tiempo analizado (9 minutos).

Número parcial de empinamientos (NPE): Es la cantidad de empinamientos realizados por los animales en cada uno de los tercios del tiempo analizado (3 minutos)

Evaluación histopatológica

Los animales se perfundieron a través del ventrículo izquierdo del corazón con formaldehído al 4% en PBS a pH 7.0. Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en esta solución algunos días. Se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones coronales de 8 micras. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para la confección de las láminas se seleccionaron tres cortes equidistantes según el atlas esterotáxico (11). La morfometría se llevó a cabo con el sistema cubano Digipat para morfometría de imágenes (12). Las imágenes se digitalizaron a x40 utilizando una tarjeta digitalizadora ATI.

Se analizó la FAD en el sector CA1 del hipocampo en los dos los hemisferios cerebrales entre y dentro de los grupos de animales. Las variables morfométricas utilizadas fueron (Fig. 1):

Fracción de área total (FAT): es la fracción de área que ocupan todas las células del estrato piramidal de CA1, con respecto al área total de cada imagen.

Fracción de área dañada (FAD): es la fracción de área ocupada por las células dañadas, con respecto al área total de la imagen.

Procesamiento estadístico:

Se empleó Microsoft Statistica, versión 6. Las diferencias significativas se tomaron a partir de una probabilidad de semejanza entre los grupos menor que 0.05. Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas estadísticas Kruskal Wallis, Wilcoxon, U de Mann-Whitney y correlación por rangos de Spearman.

En el modelo de IBT se promediaron los valores de las variables de ambos hemisferios. Eso no fue posible en el modelo de IUP porque sólo hay un hemisferio dañado.

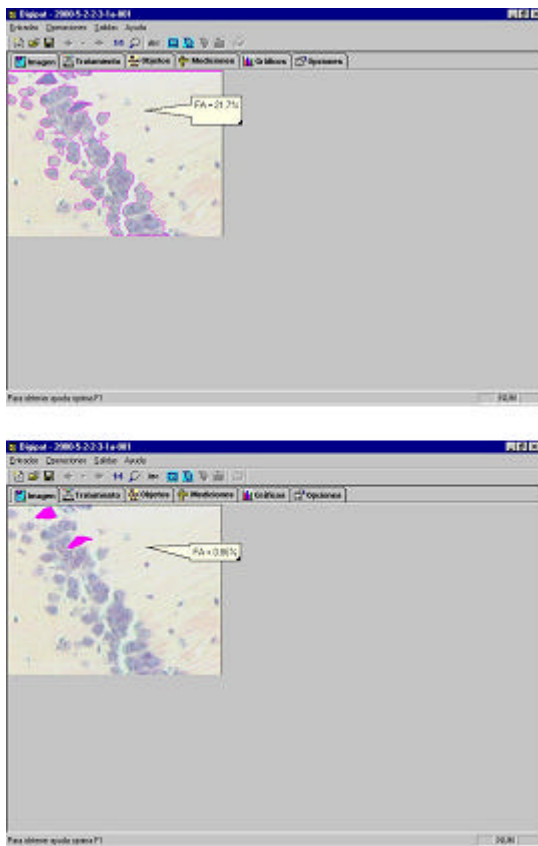


Figura 1: Pantallas del sistema Digipat. A: Fracción de área total de células en el sector CA1 del hipocampo, con respecto al área total de la imagen B: Fracción de área de células dañadas.

Resultados

1. MODELO DE ISQUEMIA UNILATERAL PERMANENTE (IUP)

El examen clínico mostró que a las 24h después de la IUP no hay diferencias entre los grupos de animales tratados con ozono o con oxígeno.

Evaluación conductual a las 24 horas y a los 7 días de la operación

A las 24 horas, el número de empinamientos en 3 minutos se comportó igual en los 3 grupos. A los 7 días sucedió lo mismo en los primeros 3 minutos, pero se contaron 6 minutos más. No hubo diferencias entre los grupos en el segundo ni el tercer tercio. El número de empinamientos en el primer tercio de tiempo fue mayor que en el tercero en los controles y en los tratados con ozono; en los animales tratados con oxígeno no hubo diferencias.

Al comparar las rectas de mejor ajuste para cada una de las curvas de habituación, la pendiente fue menor en el grupo tratado con oxígeno. No hubo diferencia significativa entre los grupos control y ozono, y sí la hubo con respecto al grupo de oxígeno (Fig. 2).

Evaluación histopatológica a las 24 horas y a los 7 días de la operación

A las 24 horas de la operación el hemisferio izquierdo (contralateral a la oclusión) en los 3 grupos apenas manifestó daño, y los 3 grupos se comportaron igual. En el hemisferio derecho (el de la oclusión) los valores de FAD en los grupos tratados con oxígeno y ozono fueron mayores que los del grupo control. Las diferencias interhemisferio no fueron significativas en los controles pero sí lo fueron en los grupos tratados con oxígeno y ozono (Fig. 3A).

A los 7 días de la operación las FAD en el hemisferio derecho en los grupos control y ozono fueron iguales y fueron menores que los valores del grupo de oxígeno. Sólo en los animales tratados con oxígeno la FAD fue mayor en el hemisferio derecho que en el izquierdo (Fig. 3B). A los 7 días de la operación, la FAD en el sector CA1 del hipocampo disminuyó con respecto a las 24 horas en los 3 grupos (Fig. 3 A y B).

A las 24 horas de la operación la variable signos clínicos de infarto (SC) se correlacionó negativamente con el número parcial de

empinamientos (NPE) ($r = -0.74$ $p < 0.05$) y positivamente con la fracción de área dañada (FADD) ($r = 0.74$ $p < 0.05$) y con la diferencia entre los hemisferios cerebrales (DIH) ($r = 0.85$ $p < 0.05$) en cuanto a FAD.

El número parcial de empinamientos (NPE) se correlacionó negativamente con la fracción de área dañada (FADD) ($r = -0.74$ $p < 0.05$) y con la diferencia entre los hemisferios (DIH) ($r = -0.85$ $p < 0.05$).

La fracción de área dañada (FADD) tuvo correlación positiva con la diferencia entre los hemisferios cerebrales (DIH) ($r = 0.62$ $p < 0.05$).

A los 7 días de la operación el número parcial de empinamientos (NPE) se correlacionó positivamente con la fracción de área dañada (FADD) ($r = 0.38$ $p < 0.05$).

2. MODELO DE ISQUEMIA BILATERAL TRANSITORIA (IBT)

No se registraron animales muertos. Tampoco aparecieron signos clínicos de infarto pues en este modelo no se desarrolla infarto cerebral.

Evaluación conductual antes y después de la operación

Al comparar las pendientes de las rectas de mejor ajuste para las curvas de habituación de los tres grupos antes y después de la operación se observó que solo disminuyó la pendiente en el grupo tratado con oxígeno (Fig. 4).

Después de la operación no hubo diferencias significativas entre los grupos en el número de empinamientos en ninguno de los 3 tercios del tiempo. La comparación intragrupos arrojó que el número de empinamientos en el primer tercio fue mayor que en el tercero en los tres grupos de animales. Los valores de pendientes de las rectas de mejor ajuste para las curvas de habituación fue menor en el grupo tratado con oxígeno con respecto al grupo control. Las diferencias entre el grupo de oxígeno y ozono no fueron significativas (Fig. 5).

Evaluación histopatológica

Después de la operación, la FAD en el sector CA1 del hipocampo se promedió en los tres grupos fue mayor en ambos grupos sometidos a isquemia con respecto a los controles. No hubo diferencias entre los grupos ozono y oxígeno (Fig. 6).

La variable pendiente de la recta de mejor ajuste para la curva de habituación (P) presentó correlación negativa con respecto a la variable fracción de área dañada (FAD) (-0.30)

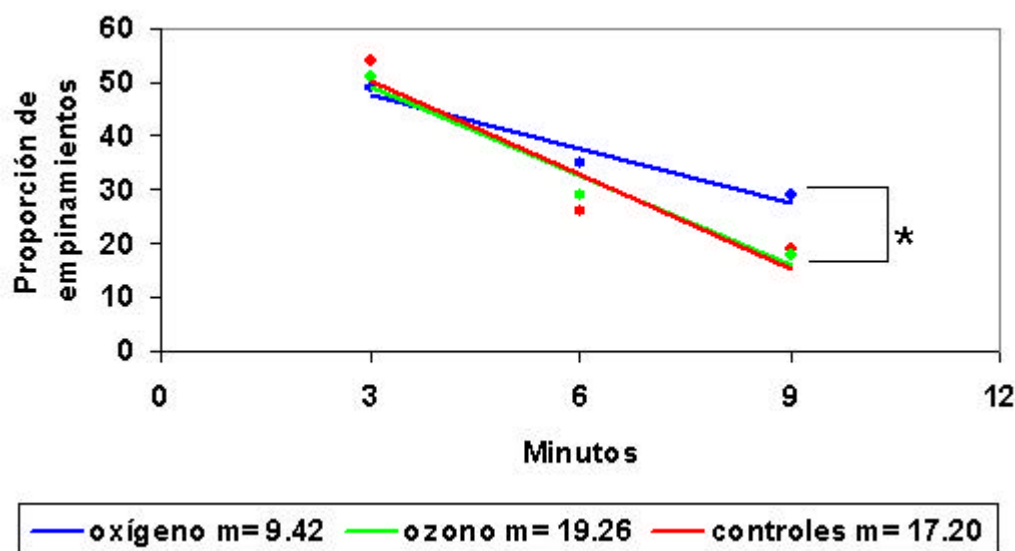


Figura 2: IUP: Rectas de mejor ajuste (promedio de valores de cada animal) para las curvas de habituación de los tres grupos 7 días después de la operación. Se da el valor absoluto de la pendiente (prueba de Kruskal Wallis).

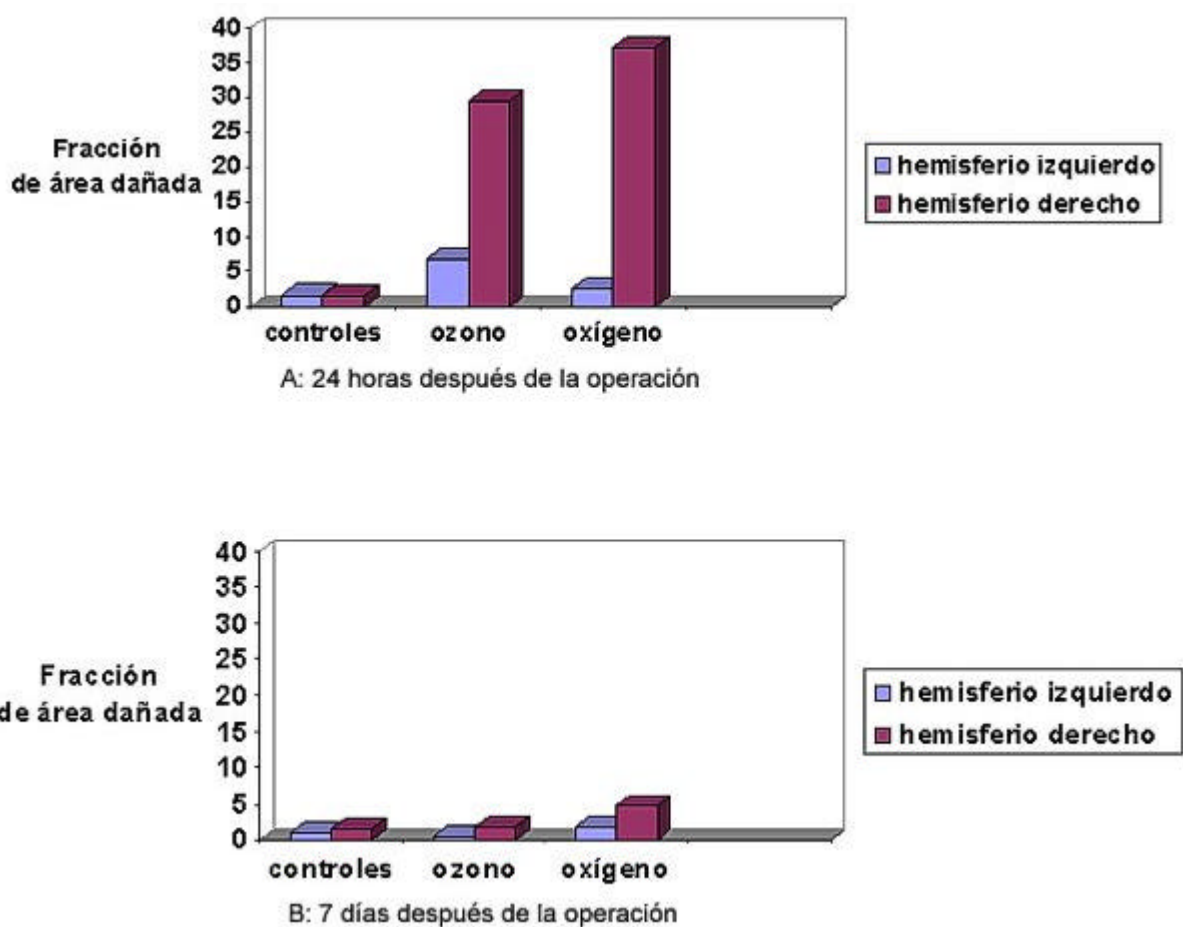


Figura 3: IUP: Fracción de área dañada en el sector CA1 del hipocampo a las **24 horas** (A) y a los **7 días** (B) de la operación (intergrupo prueba Kruskal Wallis; interhemisferio prueba de Wilcoxon).

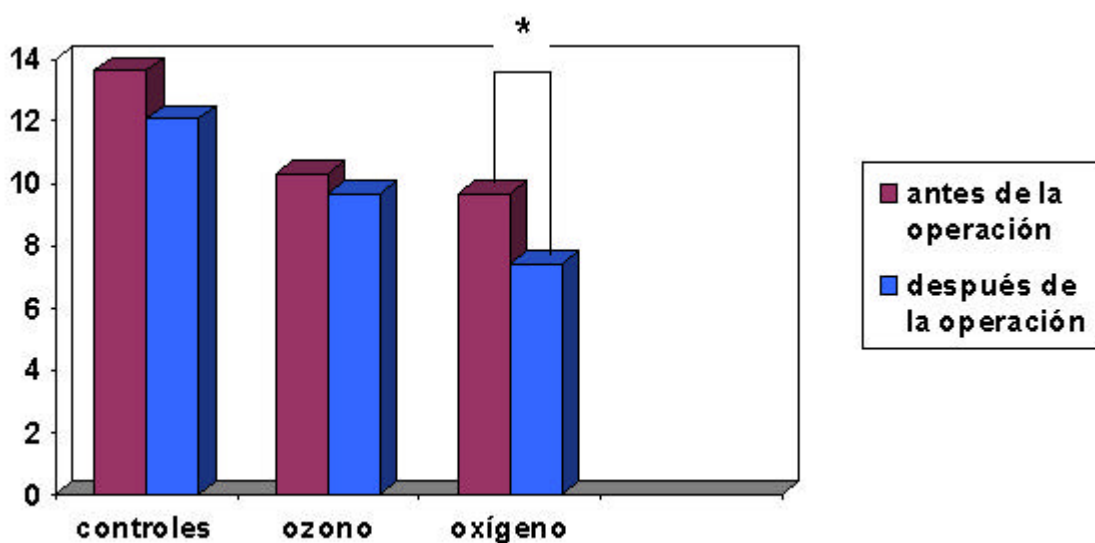


Figura 4: IBT: Pendientes de las rectas de mejor ajuste para las curvas de habituación **antes** y **después** de la operación.

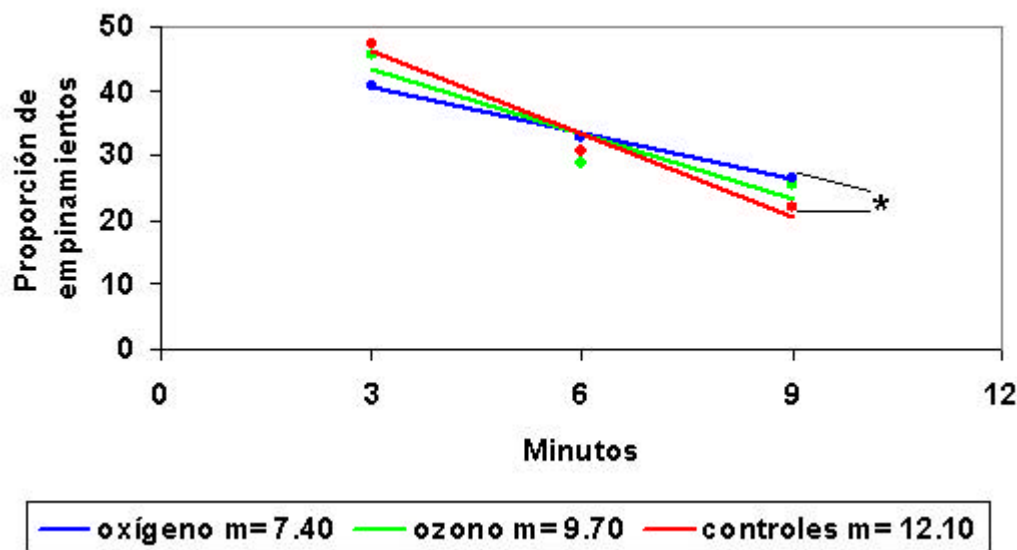


Figura 5: IBT: Rectas de mejor ajuste (promedio de valores de cada animal) para las curvas de habituación **después** de la operación. Se da el valor absoluto de la pendiente (prueba de Kruskal Wallis).

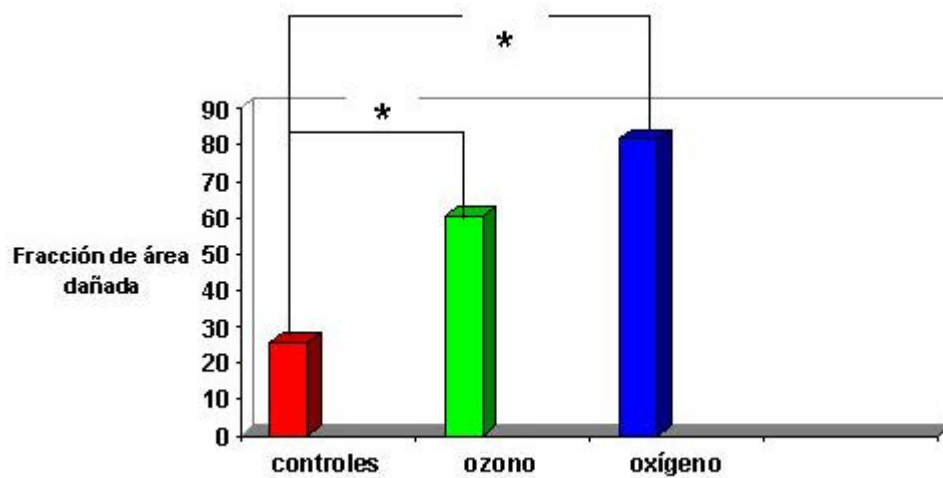


Figura 6: IBT: Fracción de área dañada **después** de la operación (prueba de Kruskal Wallis).

Discusión

1. MODELO DE ISQUEMIA UNILATERAL PERMANENTE (IUP)

A las 24 horas la disminución de la conducta exploratoria pudiera estar relacionada con una deficiencia motora, sobre todo en los animales que desarrollan signos clínicos de infarto. En cambio, a los 7 días, los gérbiles más vulnerables a la isquemia ya han muerto

y por tanto, las alteraciones en la conducta exploratoria deben expresar con mayor probabilidad un desorden cognitivo que un desorden motor. La proporción de empinamientos, variable que refleja daño a la capacidad cognitiva, fue menor a los 7 días en los grupos control y ozono, lo cual pone de manifiesto un efecto neuroprotector del pretratamiento con ozono (**Fig. 2**)

La incapacidad de reconocer lo explorado significa mantener la actividad exploratoria constante durante el tiempo registrado. Los animales que mantienen una proporción de empinamientos similar en los 3 tercios de tiempo, puede decirse que tienen una disfunción cognitiva inducida por la isquemia, encontrándose afectados el aprendizaje y la memoria.

Las neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo están comprendidas entre las neuronas más vulnerables a la isquemia(**13**). Las neuronas con receptores al N-metil D aspartato (NMDA), descritos como uno de los mediadores de la excitotoxicidad inducida por isquemia, están relacionadas con procesos de aprendizaje y memoria(**14**). Las neuronas piramidales de CA1 contienen receptores al NMDA(**15**).

A las 24 horas de la operación en el grupo tratado con ozono se observó degeneración de las neuronas piramidales en el hipocampo del lado ocluido (**Fig.3 A**) En cambio, a los 7 días, el pretratamiento con ozono sí se manifiesta como neuroprotector porque la FAD en el sector CA1 del hipocampo es igual que en el grupo control, y menor que en el grupo tratado con oxígeno (**fig. 3B**).

A los 7 días de la operación disminuye la FAD en el sector CA1 del hipocampo en los grupos tratados con ozono y oxígeno, con respecto a las 24 horas. Esto se debe a la ocurrencia de procesos de fagocitosis que dan lugar a la desaparición de las neuronas dañadas(**16**).

Las relaciones entre variables a las 24 horas reflejan el comprometimiento de las funciones motoras al poco tiempo de la operación. A los 7 días se vio que a mayor FAD en el hemisferio ocluido, el total de empinamientos es mayor. Esto permite asociar la pérdida neuronal selectiva en el hipocampo con la disfunción cognitiva, ya que los animales que no aprenden, no dejan de empinarse. Así, el efecto neuroprotector del pre-tratamiento con ozono se pone de manifiesto una semana después de la oclusión, cuando los animales más afectados ya han muerto y se ha producido una degeneración selectiva en una de las regiones más vulnerables del cerebro, característica de una situación de hipoperfusión crónica o sub-aguda y de las caídas transitorias de flujo sanguíneo cerebral. La presencia de una disfunción cognitiva en el período sub-agudo sugiere un estado de hipoperfusión hemisférica capaz de alterar la integridad funcional de las sinapsis en algunas regiones vulnerables.

2. MODELO DE ISQUEMIA BILATERAL TRANSITORIA (IBT)

En el modelo de isquemia bilateral transitoria hay evidencias de pérdida de habituación a los 7 días de la isquemia transitoria, tanto al comparar las variables un día antes y siete días después de la operación (**Fig. 4**) como en la comparación entre grupos (**Fig. 5**).

La disfunción cognitiva asociada a la isquemia se correlaciona con la muerte neuronal tardía, evidenciada a través de la presencia de neuronas conservadas en CA1. El tratamiento con ozono no llega a inhibir la degeneración piramidal en el hipocampo, sin embargo consideramos que existen indicios de protección neuronal al presentarse correlación entre el parámetro estructural (área de CA1) y el funcional (la pendiente de la recta de habituación), mediante lo que sí puede demostrarse protección relativa al tratamiento con ozono.

En el modelo de IUP cualquier efecto modificador de la expresión genética tuvo que haberse producido antes del insulto, durante el pretratamiento. Sin embargo, en la IBT, los efectos del tratamiento coexisten con el período durante el cual se producen los cambios degenerativos. Es posible que los ozónidos que llegan al tejido cerebral induzcan la expresión de genes específicos que modifiquen la respuesta celular ante la isquemia, tales como la expresión de enzimas de la defensa antioxidante, genes bloqueadores de la apoptosis o genes de factores neurotróficos que incrementen el potencial de sobrevivencia neuronal y la integridad de las sinapsis.

Conclusiones

La evaluación de la terapia con ozono en estos modelos experimentales arroja resultados que sugieren propiedades neuroprotectoras atribuibles al ozono administrado por vía rectal antes de la isquemia unilateral permanente y luego de la isquemia bilateral transitoria. Estos resultados apoyan la tesis del ozono como agente neuroprotector.

Las variables funcionales (Signos clínicos de infarto, Pendiente de la Recta de mejor ajuste para la curva de habituación y Número de empinamientos) que se midieron a las 24 horas y a los 7 días de la operación se relacionan con la FAD en el sector CA1 del hipocampo, lo cual permite utilizar las variables funcionales para hacer inferencias sobre el estado histopatológico del animal sometido a isquemia.

Bibliografía

1. - Boletín de la OMS. No. 234. Oficina OPS. Ciudad Habana, Cuba 1998.
2. - Martín R. Neuroprotección preventiva. Rev Neurol 1995; 23:30-2.
3. - Hoff JT. Cerebral protection. J Neurosurg 1986; 65(5): 579-91.
4. - León OS, Menéndez S, Merino N, et al. Ozone reactive preconditioning and its influence on calcium homeostasis. Proceedings of 14th Ozone World Congress. Ozone in medicine 1997; 11-14.
5. - Devesa E, Menéndez S, Rodríguez M.M, Gomez M, García J. Ozone therapy in ischemic cerebrovascular disease. Proceedings 11th Ozone World Congress. Ozone in medicine 1993; 10-18.
6. - Ginsberg M, Busto E. Rodent models of cerebral ischemia. Stroke 1999; 21: 65-74.
7. - Castro A, Foyo E, Pérez U, García J, Grijalva I. Comunicación arterial carotidobasilar en gerbos (*Meriones unguiculatus*). Rev Neurol. 2001; 32: 225-228.
8. - Jonas S, Trant A.Q, Eisemberg E, Azam M, Viera D, Grumet S. Does effect of neuroprotective agent on volume of experimental animal cerebral infarct predict effect of the agent on clinical outcome in human stroke? Neuroprotective agents- Third international conference. Annals of the New York Academy of Sciences 1997; 825: 281 -287.
9. - Guide for care and use of laboratory animals. National research. Council. Washington DC. 1996.
10. - Guidelines for breeding and care of Laboratory Animals World Health Organization and Institutional Council for Laboratory Animals Science (ICLAS). 1998.
11. - Loskota WJ, Lomax P, Verity MA. A stereotaxic atlas of the Mongolian gerbil brain (*Meriones unguiculatus*) Ann Arbor Science Publishers Inc. 1974.
12. - Coro RM, Borrajeró I. DIGIPAT: Un sistema cubano para morfometría de imágenes. Rev Lat Patol 1996; 34 (1): 9-10.
13. - Bonnekoh P. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5 minute ischemia and long survival times. Acta Neuropathol 1990; 80: 18-25.
14. - Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature 1986; 319: 774-776.
15. - Takumi Y, Ramirez-León V, Laake P, Ottersen OP. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. Nat Neurosci 1999; 2: 619-24.
16. - Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev. 1999; 79 (4):1431 -568.