

Protocolo para el estudio multicéntrico del efecto protector de la rGOT en modelo *in vivo* de isquemia cerebral

Grupo de Ictus Traslacional - Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS)

Índice

Detalles del protocolo	3
Grupos participantes	5
Selección, estabulación y cuidado de animales	6
Inducción del modelo	7
Grupo TREAT (IP: Fran Campos)	7
Grupo Unidad de Investigación Neurovascular (IP: Ignacio Lizosoain).....	9
Grupo Neurología y Enfermedades Cerebrovasculares (IP: María Gutiérrez)	9
Grupo Unidad de Investigación (IP: Tomás Segura)	10
Grupo Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular (IP: Juan B. Salom).....	11
Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada	13
Seguimiento de peso, de test funcional y punto final	15
Resumen	17
Procedimiento completo.....	17
Aleatorización.....	18

Detalles del protocolo

Fecha	30/05/2024 (Versión 2)
Historial de versiones	Versión 1: 1_Protocolo - Estudio in vivo en ratas_08-04-2024
Autores	Esteban López Arias, Sonia López Amoedo, Francisco Campos
Ámbito de aplicación	Estudio multicéntrico para la evaluación terapéutica de la enzima rGOT como fármaco para la isquemia cerebral en modelos <i>in vivo</i>
Revisor del protocolo	Francisco Campos
Introducción	<p>El grupo de Ictus traslacional del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) liderado por el Dr. Francisco Campos ha mantenido durante años una línea de investigación traslacional en la isquemia cerebral basada en el análisis terapéutico de la forma recombinante de la enzima GOT (transaminasa glutámico-oxalacética; rGOT). Recientes resultados obtenidos por dicho grupo muestran una reducción del volumen de infarto en ratas tratadas con rGOT y sometidas a una isquemia cerebral transitoria en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media mediante filamento intraluminal. La dosis que resultó más efectiva es la de 1 mg de rGOT por kg de peso de rata administrada cuatro veces: 1º justo tras la reperfusión del flujo sanguíneo, 2º 2 horas después, 3º 5 horas después de la reperfusión, y 4º 8 horas después de la reperfusión (ver Figura 1).</p> <p>Además, también se han realizado análisis de citoprotección en modelos de isquemia cerebral <i>in vitro</i>, observando que la adición de rGOT al medio de cultivo tras OGD (<i>Oxygen and Glucose Deprivation</i>) en un cultivo de neuronas disminuye niveles de marcadores de apoptosis, así como de daño mitocondrial.</p> <p>Con el objetivo de validar de forma ciega e independiente los resultados obtenidos previamente con la rGOT, se propone un estudio multicéntrico entre los diferentes grupos de la Red RICORS-ICTUS con experiencia en el estudio básico-traslacional de la isquemia cerebral que deseen participar y puedan cumplir las condiciones de experimentación.</p> <p>Se propone un estudio <i>in vivo</i> en el que se administrará GOT a un modelo de isquemia cerebral siguiendo la pauta y la dosis que mejores resultados ha dado en los estudios previos, esto es, 4 inyecciones de 1 mg/kg empezando justo tras la reperfusión y 2, 5 y 8 horas después, siendo el objetivo principal el estudio del volumen de infarto a 14 días y los objetivos secundarios, test funcionales.</p> <p>En este documento se establece el protocolo de actuación y se compone de las siguientes partes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Grupos participantes ● Selección, estabulación y cuidado de animales. ● Inducción del modelo. ● Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada. ● Seguimiento de peso, de test funcional y punto final.

NOTA IMPORTANTE: si alguna de las condiciones o procedimientos no se pueden realizar exactamente como establece el protocolo se debe de indicar al grupo coordinador previamente.

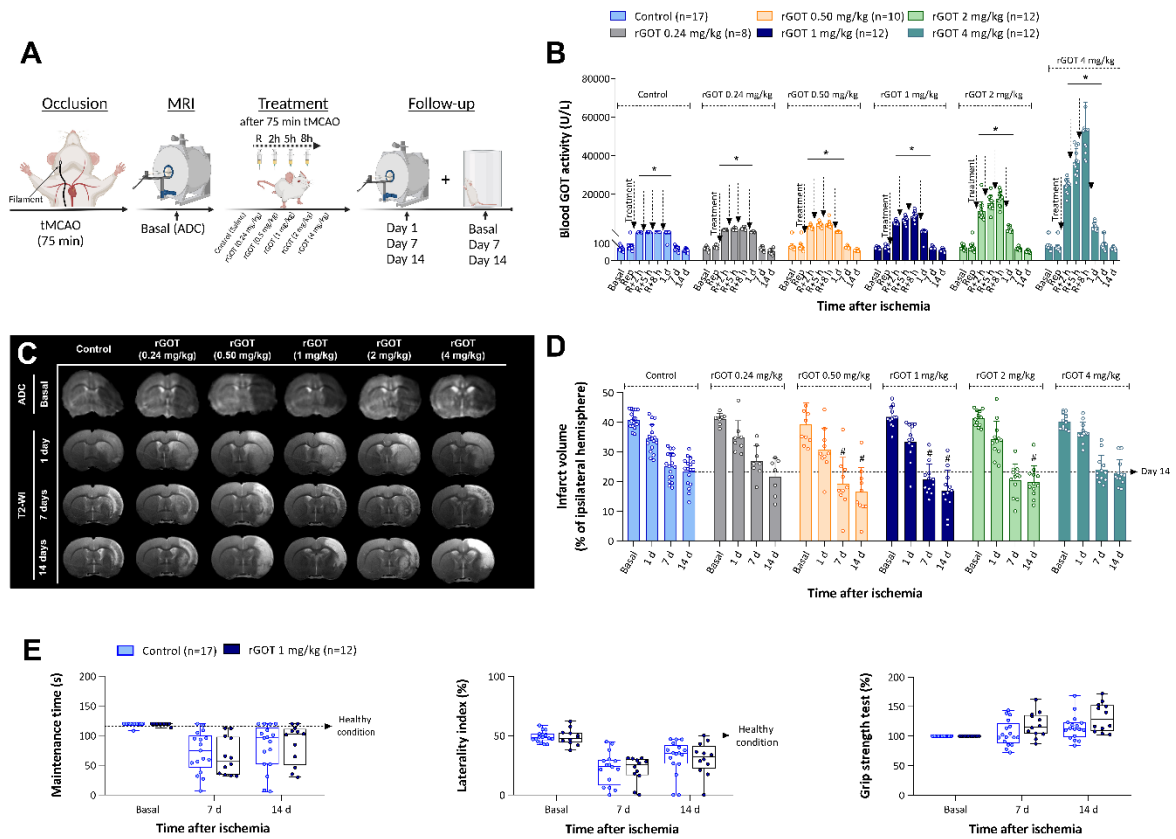


Figura 1: Estudio terapéutico de rGOT en ratas con isquemia cerebral. **(A)** Esquema del diseño experimental. Los tratamientos (solución salina y rGOT a 0,24, 0,5, 1, 2 y 4 mg/kg) se administraron i.v. en cuatro tiempos (justo después de la reperusión, 2 h después de la reperusión, 5 h después de la reperusión y 8 h después de la reperusión) tras 75 min de oclusión de la arteria cerebral media en grupos independientes. La lesión isquémica se midió por resonancia magnética (RM) el día 0 mediante mapas ADC (durante la oclusión de la arteria cerebral) y los días 1, 7 y 14 tras la inducción de la isquemia mediante mapas T2. La evaluación de la lesión basal el día 0 se utilizó para confirmar volúmenes de lesión similares (35-45%) en todos los animales incluidos antes de la administración del tratamiento. Las pruebas motoras y somatosensoriales se evaluaron mediante la prueba rotarod, la prueba del cilindro y la fuerza de agarre, 1 día antes de la cirugía (basal) y 7 y 14 días después de la isquemia. **(B)** Evolución temporal de la actividad GOT en sangre. **(C)** Análisis por RM de la evolución de la isquemia. **(D)** Evaluación del tamaño del infarto. La lesión isquémica se muestra en % de lesión con respecto al hemisferio ipsilateral. La línea discontinua representa el volumen del infarto a los 14 días del grupo control, utilizándolo como referencia para ver el efecto de los tratamientos. **(E)** Evaluación de la función sensoriomotora mediante rotarod, el test del cilindro y la fuerza de agarre.

Grupos participantes

Los grupos participantes en el estudio son los siguientes:

- **Grupo coordinador:** TREAT
 - **IP:** Francisco Campos Pérez (francisco.campos.perez@sergas.es).
 - **Institución:** Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS).
 - **Otros/as investigadores/as participantes:** Esteban López Arias (esteban.lopez.arias@sergas.es).
- **Grupo investigador:** Unidad de Investigación Neurovascular
 - **IP:** Ignacio Lizasoain (ignacio.lizasoain@med.ucm.es).
 - **Institución:** Instituto de Investigación Biomédica Hospital Doce de Octubre (IMAS12).
 - **Otros/as investigadores/as participantes:** Jesús Pradillo (jmpradil@ucm.es); Macarena Hernández (macarenh@ucm.es); Manuel Navarro (manuna02@ucm.es).
- **Grupo investigador:** Neurología y Enfermedades Cerebrovasculares
 - **IP:** María Gutiérrez Fernández (mariagutierrezfdez@hotmail.com).
 - **Institución:** Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IDIPAZ).
 - **Otros/as investigadores/as participantes:** Blanca Fuentes Gimeno (blanca.fuentes@salud.madrid.org).
- **Grupo investigador:** Unidad de Investigación
 - **IP:** Tomás Segura Martín (tseguram@gmail.com).
 - **Institución:** Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (SECAM).
 - **Otros/as investigadores/as participantes:** Gemma Serrano de las Heras (gemmas@sescam.jccm.es), Mónica Gómez (mgomezj@sescam.jccm.es), María G Picazo (mgpicazo@sescam.jccm.es).
- **Grupo investigador:** Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular
 - **IP:** Juan B. Salom Sanvalero (salom_jba@gva.es; juan.salom@uv.es).
 - **Institución:** Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS LA FE).
 - **Otros/as investigadores/as participantes:** Mikahela A. López Morales (mikahela_lopez@iislafe.es), Alicia Aliena (a.aliena.v@gmail.com).

Todos ellos pertenecen a la Red de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud en ICTUS (RICORS-ICTUS).

Antes de comenzar el estudio todos los grupos aceptarán el protocolo siendo éste propuesta del grupo coordinador pero resultado de la participación y negociación de todos. El protocolo será en su mayor parte común a todos los grupos con la excepción del tipo de modelo de isquemia al adaptarse a la experiencia de cada grupo y la cepa de animal de experimentación a utilizar por pragmatismo logístico y debido a que las diferencias que presentan las cepas pueden alterar la varianza en los resultados y hacer así el cálculo del tamaño muestral inválido. De este modo el reparto se establece de la siguiente forma:

Grupo	Modelo	Cepa
TREAT	tMCAO 60'	Sprague-Dawley ♂ 250 g
Unidad de Investigación Neurovascular	Oclusión permanente de la ACC con sutura y ACM con cloruro férrico	Wistar ♂ 250-350 g
Neurología y Enfermedades Cerebrovasculares	Oclusión permanente de ACM con sutura	Sprague-Dawley ♂ 250 g
Unidad de Investigación	Oclusión permanente de ACM con sutura	Wistar ♂ 250-350 g
Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular	tMCAO 60'	Wistar ♂ 300 g

Selección, estabulación y cuidado de animales

Objetivo	Incluir en el proyecto ratas de similares características y mantenerlas con los cuidados adecuados evitando lo máximo posible el estrés y cualquier otro sesgo derivado de su cuidado
Materiales y equipos	Instalación adecuada para el alojamiento de ratas de experimentación.
Personal	El personal dedicado a la estabulación y cuidado de las ratas debe estar en posesión de la Función A (Cuidado de animales) del Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación u otros fines científicos, incluyendo docencia conforme a la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.
Protocolo	Los animales se estabularán al menos una semana antes de la inducción del modelo. Se mantendrá la sala de alojamiento a 22 °C ± 1, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h y los animales tendrán libre acceso a agua y comida durante toda su estancia. Se vigilará que los animales estén siempre en buenas condiciones.

Inducción del modelo

Objetivo	Inducir isquemia cerebral focal, permanente o transitoria, mediante oclusión de la arteria cerebral media
Referencias	Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. <i>Stroke</i> , 20(1), 84-91.
Materiales y equipos	Lupa para microcirugía. Sistema de anestesia para roedores de sevoflurano conectado a instalación de gases para O ₂ y NO ₂ . Manta calefactora. Sistema de medición de flujo sanguíneo por Doppler Sonda rígida para sistema Doppler. Taladro para microcirugía con fresa de cabeza redonda de 0.7-0.9 mm de \varnothing .
Instrumental	Afeitadora. Solución yodada. Gasas o bastoncillos. Pinzas de tamaños variados. Tijeras. Tijeras de resorte. Portaagujas. Suturas 4-0 y 6-0. Electrocoagulador.
Personal	El personal dedicado a la realización del modelo debe estar en posesión de la Función C (Realización de los procedimientos) del Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación o otro fines científicos, incluyendo docencia conforme a la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.
Elementos comunes	La inducción del modelo se realizará durante el ciclo diurno del animal y entre las 8:00 y las 13:00. Durante la cirugía se mantendrá al animal con una temperatura corporal de 37° C.

Cálculo del tamaño muestral

Se ha estimado, para cada laboratorio, la media del grupo rGOT a partir de tres porcentajes de reducción esperados (10, 20, o 30 %). Para estimar la SD del grupo rGOT, se ha calculado el coeficiente de variación de este grupo con los datos del estudio previo, y se ha asumido el mismo coeficiente de variación (0.4) para el resto de laboratorios/modelos. Una vez estimadas las medias y SDs de los rGOT, se han calculado los tamaños del efecto, que al ser una *independent t-test* (comparación de medias entre dos grupos diferentes), corresponde a la *d* de Cohen. En base a la *d* de Cohen, asumiendo una potencia de 0.8 y un nivel de significación de 0.05, se han estimado las *Ns* necesarias para detectar ese tamaño del efecto de forma significativa.

A la vista de las *Ns* resultantes, se ha elegido un efecto esperado de 30% de reducción en el volumen de infarto (es decir, tamaños de efecto por encima de 1). De este modo validamos en el estudio multicéntrico los resultados obtenidos en el estudio piloto (27,615%). Además, intuyo que es un número de animales asumible por los grupos participantes, que quizás decidan no participar si se incrementa mucho el número necesario de animales para detectar efectos menores. **El cálculo se ha realizado mediante el software G*Power.**

Grupo TREAT (IP: Fran Campos)

Descripción	Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) de 60 min
Animales	Sprague-Dawley macho de 250±25 g. n = 12 por grupo, calculado para los siguientes valores: Media de población control: 23.371 Desviación típica de población control: 4.853 Diferencia de medias esperada: 30%
Protocolo	Se induce la anestesia a 5-6% de sevoflurano en una mezcla de gases de O ₂ :NO ₂ de 30:70, y se mantiene a 3.5-4% de sevoflurano en la misma mezcla. Se posiciona al animal en la manta calefactora en decúbito prono con la cabeza ligeramente ladeada para tener en el campo de visión de la lupa la región entre la oreja y el ojo derechos. Se afeita la zona y se desinfecta con solución yodada. Se hace una incisión desde el inicio de la oreja hasta unos tres mm dorsal al ojo exponiendo el músculo temporal. Se corta y se levanta un fragmento del músculo (el más pequeño posible) hasta exponer el cráneo. Se realiza una pequeña muesca en el cráneo con el taladro con cuidado de no traspasarlo (esta muesca solo sirve para apoyar más tarde la sonda Doppler).

	<p>Se posiciona al animal en decúbito supino, se afeita la zona ventral del cuello y se desinfecta con solución yodada.</p> <p>Se realiza una incisión de unos 2 cm desde el punto entre las clavículas por la línea media.</p> <p>Se aísla ligeramente por la parte central el esternocleidomastoideo izquierdo hasta encontrar la arteria carótida común izquierda, esta se aísla (con cuidado de no dañar el nervio vago) y se rodea con una sutura 6-0 de un par de cm de largo que se usará más tarde.</p> <p>Se aíslan los músculos esternocleidomastoideo y omohioideo derechos, se rodean con una sutura 4/0, y con ayuda de esta se apartan hacia nuestra izquierda y derecha, respectivamente, exponiendo la arteria carótida común y su ramificación.</p> <p>Se aíslan y se rodean con una sutura 6/0 las arterias carótida común, carótida interna y carótida externa. En la externa se realiza doble nudo en la parte más rostral posible. En la común, doble nudo en la parte más caudal posible. Y en la interna, un lazo. Se cauterizan las arteriolas que salen de la carótida externa.</p> <p>Se realiza una pequeña incisión en la externa caudalmente al doble nudo, por la que se introduce el filamento Doccol 403912; este se asegura con un nudo simple que rodea a la externa caudalmente a la incisión y se secciona totalmente la carótida externa con el fin de poder dirigir el filamento hacia la interna.</p> <p>Se libera el lazo de la carótida interna y se dirige el filamento por ella introduciéndolo con cuidado de no hacerlo entrar en la arteria pterigopalatina.</p> <p>En este punto se coloca la sonda Doppler en la muesca hecha anteriormente en el cráneo y se empieza a grabar el registro, grabando unos 4-5 min de registro basal.</p> <p>Pasados esos 4-5 min se realiza un lazo en la sutura antes colocada alrededor de la arteria carótida común izquierda.</p> <p>Se introduce el filamento hasta ver la caída en el registro Doppler, y se asegura esa posición apretando el nudo; en ese momento se empieza a contar el tiempo de oclusión de la arteria cerebral media.</p> <p>Tiempo de oclusión: 60 min.</p> <p>Una vez concluido el tiempo oclusión se retira el filamento y se deshace el lazo de la carótida común contralateral.</p> <p>[En este punto se realiza la primera inyección del tratamiento. VER más adelante “Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada”]</p> <p>El filamento se extrae dejando doble nudo en la carótida interna y se sutura la incisión.</p> <p>La grabación del registro Doppler puede pararse y la sonda retirarse. La incisión de la cabeza también debe ser suturada.</p> <p>Se aplica solución yodada a las incisiones, así como un anestésico local (p. ej. lidocaína).</p>
<p>Criterios de inclusión y exclusión</p>	<p>Para incluir un animal este debe tener una caída en el registro Doppler de entre el 70 y el 90% con respecto al basal en el momento de oclusión de la arteria cerebral media. Esta caída se debe mantener a lo largo de los 60-75 min de oclusión.</p> <p>Tras la retirada de filamento y la recanalización de la carótida común contralateral al finalizar el tiempo de oclusión, el registro Doppler debe subir al 90-140% respecto al basal.</p> <p>El animal debe despertar en buenas condiciones. Convulsiones o extrema inactividad implican exclusión del animal y la aplicación del</p>

	punto final humanitario.
Precauciones postcirugía	Se debe dejar despertar al animal bien bajo una luz infrarroja, bien sobre una manta calefactora

Grupo Unidad de Investigación Neurovascular (IP: Ignacio Liza soain)

Animales	Rata Wistar macho de 250-350g
Protocolo	<p>Se induce la anestesia a 5% de isoflurano en una mezcla de gases de O₂:NO₂ de 30:70. Una vez dormido el animal, se pesa y se devuelve al vaporizador de anestesia donde se le mantiene esta a 1.5-2.5% de isoflurano en la misma mezcla durante toda la cirugía.</p> <p>Se posiciona al animal en la manta calefactora en decúbito supino, se afeita la zona ventral del cuello y se desinfecta con solución yodada.</p> <p>Se realiza una incisión de unos 2 cm desde el punto entre las clavículas por la línea media.</p> <p>Se aísla ligeramente por la parte central el esternocleidomastoideo izquierdo hasta encontrar la arteria carótida común izquierda, esta se aísla (con cuidado de no dañar el nervio vago) y se liga de forma permanente con una sutura 3-0.</p> <p>Se vuelve a colocar la arteria en su posición original, los músculos del cuello, etc, y se cierra la herida con sutura de 3-0 y se desinfecta la herida con una solución yodada.</p> <p>Seguidamente, se posiciona al animal en decúbito prono, girando la cabeza hacia el lado izquierdo para tener una visión de la región que comprende la oreja y el ojo izquierdos.</p> <p>Se afeita la zona y se desinfecta con solución yodada.</p> <p>Se hace una incisión desde el inicio de la oreja hasta unos tres mm dorsal al ojo exponiendo el músculo temporal.</p> <p>Se corta y se levanta dicho músculo hasta exponer el cráneo.</p> <p>Se realiza una craniectomía con un microtaladro, que comprende parte de la placa temporal hacia la parte ocular, sin dañar el arco zigomático.</p> <p>Se retira el hueso.</p> <p>Una vez visualizada la ACM, se corta un trozo de papel Whatmann del tamaño de la craniectomía realizada, y se impregna en una solución de 20% de FeCl₃ en solución salina y se posiciona sobre la MCA durante un tiempo de 10min. Tras este tiempo, y tras comprobar bajo la lupa la oclusión de la arteria, se limpia la zona con solución salina estéril, se coloca de nuevo en su lugar el músculo temporal y se procede a cerrar la herida con una sutura de 3-0. Posteriormente se desinfecta dicha herida mediante el uso de una solución yodada.</p> <p>Finalmente, se le inyecta 5ml de suero salino estéril por vía subcutánea, para rehidratar al animal, y utilizando la misma vía se inyecta la dosis correspondiente a su peso de buprenorfina (Buprex) como analgesia.</p>

Criterios de inclusión y exclusión	Los animales a excluir serán aquellos que no muestren ocluida la ACM bajo la lupa tras los 10min de exposición al FeCl ₃ y aquellos que a pesar de haberse ocluido dicha arteria no muestren infarto a las 24h de la cirugía medido mediante MRI.
Precauciones postcirugía	Se debe dejar despertar al animal sobre una manta calefactora y comprobar su estado.

Grupo Neurología y Enfermedades Cerebrovasculares (IP: María Gutiérrez)

Animales	Sprague-Dawley macho de 250±25 g. n = 13 por grupo, , calculado para los siguientes valores: Media de población control: 18.91 Desviación típica de población control: 4.44 Diferencia de medias esperada: 30%
Protocolo	Se realizará una pequeña craneotomía por encima de la fisura Rhinal sobre la rama de la ACM derecha. La rama de la ACM se ligará de forma permanente con una sutura de 9/0 antes de su bifurcación entre las ramas frontal y parietal. Acto seguido, se ocluirán ambas arterias carótidas comunes durante 60 minutos. [En este punto se realiza la primera inyección del tratamiento. VER más adelante "Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada"] Durante toda la cirugía la temperatura corporal del animal se mantendrá a ≈ 37 °C con una manta térmica. La sutura de 9/0 es sutura quirúrgica de poliamida, monofilamento. Dafilon.
Criterios de inclusión y exclusión	La oclusión de la ACM se observa a través del microscopio quirúrgico. En aquellos animales en los que no se observe interrupción del FSC por medio del microscopio quirúrgico son excluidos del estudio.
Precauciones postcirugía	Se debe dejar despertar al animal bien bajo una luz infrarroja, bien sobre una manta calefactora

Grupo Unidad de Investigación (IP: Tomás Segura)

Animales	Wistar macho de 300±50 g. n = 13 por grupo, , calculado para los siguientes valores: Media de población control: 8.75 Desviación típica de población control: 1.92
-----------------	--

	Diferencia de medias esperada: 30%
Protocolo	Se realiza en primer lugar una incisión en la línea media del cuello y se accede a la arteria carótida común izquierda (ACCi). Ésta se ocluye de forma permanente con una sutura de seda de 6/0. A continuación, se realiza una craneotomía por encima de la fisura rhinal sobre la arteria cerebral media izquierda (ACMi). La oclusión distal de la ACMi se realiza justo antes de su bifurcación en ramas frontal y parietal de forma permanente con una sutura de nylon de 9/0 (ETHILON: poliamida 9/0, monofilamento, 3/8, no absorbible). [60 minutos después de la oclusión de la ACM se realiza la primera inyección del tratamiento. VER más adelante “Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada”]
Criterios de inclusión y exclusión	La oclusión de la ACM se observa a través del microscopio quirúrgico. En aquellos animales en los que no se observe interrupción del FSC por medio del microscopio quirúrgico son excluidos del estudio.
Precauciones postcirugía	Se debe dejar despertar al animal bien bajo una luz infrarroja, bien sobre una manta calefactora

Grupo Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular (IP: Juan B. Salom)

Animales	Wistar hembra ovariectomizada de 280±25 g. n = 9 por grupo, calculado para los siguientes valores: Media de población control: 30.27 Desviación típica de población control: 2.91 Diferencia de medias esperada: 30%
Protocolo	Se induce la anestesia a 5-6% de sevoflurano en una mezcla de gases de O ₂ :NO ₂ de 30:70, y se mantiene a 3.5-4% de sevoflurano en la misma mezcla. Se posiciona al animal en la manta calefactora en decúbito prono con la cabeza ligeramente ladeada para tener en el campo de visión de la lupa la región entre la oreja y el ojo derechos. Se afeita la zona y se desinfecta con solución yodada. Se hace una incisión desde el inicio de la oreja hasta unos tres mm dorsal al ojo exponiendo el músculo temporal. Se corta y se levanta un fragmento del músculo (el más pequeño posible) hasta exponer el cráneo. Se realiza una pequeña muesca en el cráneo con el taladro con cuidado de no traspasarlo (esta muesca solo sirve para apoyar más tarde la sonda Doppler). Se posiciona al animal en decúbito supino, se afeita la zona ventral del cuello y se desinfecta con solución yodada. Se realiza una incisión de unos 2 cm desde el punto entre las clavículas por la línea media. Se aísla ligeramente por la parte central el esternocleidomastoideo izquierdo hasta encontrar la arteria carótida común izquierda, esta se

	<p>aísala (con cuidado de no dañar el nervio vago) y se rodea con una sutura 6-0 de un par de cm de largo que se usará más tarde.</p> <p>Se aíslan los músculos esternocleidomastoideo y omohioideo derechos, se rodean con una sutura 4/0, y con ayuda de esta se apartan hacia nuestra izquierda y derecha, respectivamente, exponiendo la arteria carótida común y su ramificación.</p> <p>Se aíslan y se rodean con una sutura 6/0 las arterias carótida común, carótida interna y carótida externa. En la externa se realiza doble nudo en la parte más rostral posible. En la común, doble nudo en la parte más caudal posible. Y en la interna, un lazo. Se cauterizan las arteriolas que salen de la carótida externa.</p> <p>Se realiza una pequeña incisión en la externa caudalmente al doble nudo, por la que se introduce el filamento Docol 403756; este se asegura con un nudo simple que rodea a la externa caudalmente a la incisión y se secciona totalmente la carótida externa con el fin de poder dirigir el filamento hacia la interna.</p> <p>Se libera el lazo de la carótida interna y se dirige el filamento por ella introduciéndolo con cuidado de no hacerlo entrar en la arteria pterigopalatina.</p> <p>En este punto se coloca la sonda Doppler en la muesca hecha anteriormente en el cráneo y se empieza a grabar el registro, grabando unos 4-5 min de registro basal.</p> <p>Pasados esos 4-5 min se realiza un lazo en la sutura antes colocada alrededor de la arteria carótida común izquierda.</p> <p>Se introduce el filamento hasta ver la caída en el registro Doppler, y se asegura esa posición apretando el nudo; en ese momento se empieza a contar el tiempo de oclusión de la arteria cerebral media.</p> <p>Tiempo de oclusión: 60 min.</p> <p>Una vez concluido el tiempo oclusión se retira el filamento y se deshace el lazo de la carótida común contralateral.</p> <p>[En este punto se realiza la primera inyección del tratamiento. VER más adelante "Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada"]</p> <p>El filamento se extrae dejando doble nudo en la carótida interna y se sutura la incisión.</p> <p>La grabación del registro Doppler puede pararse y la sonda retirarse. La incisión de la cabeza también debe ser suturada.</p> <p>Se aplica solución yodada a las incisiones, así como un anestésico local (p. ej. lidocaína).</p>
<p>Criterios de inclusión y exclusión</p>	<p>Para incluir un animal este debe tener una caída en el registro Doppler de entre el 70 y el 90% con respecto al basal en el momento de oclusión de la arteria cerebral media. Esta caída se debe mantener a lo largo de los 60-75 min de oclusión.</p> <p>Tras la retirada de filamento y la recanalización de la carótida común contralateral al finalizar el tiempo de oclusión, el registro Doppler debe subir al 90-140% respecto al basal.</p> <p>El animal debe despertar en buenas condiciones. Convulsiones o extrema inactividad implican exclusión del animal y la aplicación del punto final humanitario.</p>
<p>Precauciones postcirugía</p>	<p>Se debe dejar despertar al animal bien bajo una luz infrarroja, bien sobre una manta calefactora</p>

Administración de tratamiento de forma ciega y aleatorizada

Objetivo	Dividir de forma aleatorizada los sujetos de estudio en dos grupos: uno tratado con el fármaco a estudio y otro tratado con su vehículo, y establecer la pauta de administración que se hará de forma ciega.
Materiales y equipos	Sistema de anestesia para roedores de sevoflurano conectado a instalación de gases para O ₂ y NO ₂ . Alícuota de tratamiento (A o B). Suero salino estéril.
Instrumental	Jeringa de 1 ml. Cánulas intravenosas.
Personal	El personal dedicado a la administración del tratamiento debe estar en posesión de la Función C (Realización de los procedimientos) del Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación o otros fines científicos, incluyendo docencia conforme a la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.
Protocolo	<p>Los tratamientos (A o B) deben ser asignados al azar a cada una de las ratas previamente. Esta aleatorización debe ser llevada a cabo por cada uno de los laboratorios colaboradores y mantenida en secreto hasta la finalización del proyecto. Cuando todas las variables estén medidas se revelará tanto la correspondencia de los tratamientos A/B como la aleatorización de los animales; así las cirugías, la administración de tratamiento, la evaluación de los test funcionales y la medición de volúmenes de infarto se harán de forma ciega.</p> <p>Se administra el tratamiento de forma intravenosa por la vena caudal (se adjunta video explicativo) en cuatro inyecciones en total en cada animal y con un volumen de 1 ml en cada inyección.</p> <p>La pauta de administración de tratamiento es la siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 1ª justo después de la reperusión (es decir, una vez retirado el filamento y desocluida la arteria carótida común contralateral) en el caso de la tMCAO; al desocluir las arterias carótidas comunes en el caso de oclusión permanente de la ACM con oclusión de 60 min de las carótidas; 60 min después de la oclusión de la arteria carótida común izquierda en el caso de oclusión permanente de la ACM con oclusión permanente de la carótida común izquierda. ● 2ª 2 horas después de la 1ª inyección. ● 3ª 5 h después de la 1ª inyección. ● 4ª 8 h después de la 1ª inyección. <p>Se pesa al animal antes de la inducción del modelo de isquemia. Para cada inyección se retira de la alícuota de tratamiento (A o B, el que corresponda a ese animal) el mismo número de µl que gramos pesa la rata, este volumen se lleva hasta 1 ml con suero salino.</p> <p>Para cada inyección se siguen los siguientes pasos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Se induce la anestesia a 5-6% de sevoflurano en una mezcla

	<p>de gases de O₂:NO₂ de 30:70, y se mantiene a 3.5-4% de sevoflurano en la misma mezcla.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Se posiciona al animal en la manta calefactora en decúbito lateral, colocando la cola encima de la manta el tiempo suficiente para calentarla y dilatar sus vasos. ● Se introduce la cánula en la vena lateral caudal con el bisel hacia arriba y, tras retirar la aguja, se acopla la jeringa con el tratamiento que corresponda con cuidado de evitar burbujas de aire. ● Se inyecta el tratamiento. ● Al retirar la cánula se tapa el lugar de inyección para evitar sangrado y/o pérdida de tratamiento. <p>Para la primera inyección, al ser justo después de la reperusión y ya estar anestesiada la rata, el primer paso se obvia.</p>
<p>Criterios de inclusión y exclusión</p>	<p>La inyección se debe hacer lentamente y el émbolo se debe poder presionar fácilmente.</p> <p>Si hay indicios de extravasación del tratamiento o se observa claramente la expulsión del mismo, ese sujeto quedará excluido.</p>

Seguimiento de peso, de test funcional y punto final

Objetivo	Recoger los datos necesarios para analizar la evolución de los animales en relación a las consecuencias patológicas de la isquemia cerebral.
Referencias	T Schallert, S M Fleming, J L Leasure, J L Tillerson, S T Bland. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. <i>Neuropharmacology</i> 2000; 39: 777-787. Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., & Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. <i>Stroke</i> , 17(3), 472-476.
Materiales y equipos	Báscula. Un cilindro de plástico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Una plataforma transparente (aunque no es estrictamente necesario como se aclara más adelante). Una videocámara o un aparato que grabe video (un móvil, por ejemplo). Un soporte para la videocámara o el móvil que permita la grabación en la posición adecuada.
Instrumental	Material de cirugía necesario para la decapitación y extracción de cerebro (habitualmente pinzas de tamaños variados, tijeras de diferente tamaño, portaagujas, espátula pequeña). Matriz para corte axial de cerebro de rata. PBS (tampón fosfato salino). TTC (cloruro de tetrazolio).
Personal	El personal dedicado a la realización de test debe estar en posesión de la Función C (Realización de los procedimientos) y el personal dedicado al sacrificio de los animales debe estar en posesión de la Función B (Eutanasia) del Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación u otros fines científicos, incluyendo docencia conforme a la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.
Protocolo	Se pesará cada animal antes de la inducción del modelo, y a los 7 y 14 días. Protocolo para el test de cilindro : <ul style="list-style-type: none"> • Se sitúa al animal en el interior de un cilindro de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura con la base transparente. El comportamiento de la rata se graba con una videocámara colocada por debajo de la base. La grabación se realiza durante 10 minutos y siempre en el ciclo nocturno del animal, ya que es su ciclo de actividad (la grabación también puede ser desde arriba, con tal de que en el video esté encuadrado el cilindro de tal forma que se vean sus paredes y así poder distinguir los apoyos que hace el animal con sus patas delanteras).

	<ul style="list-style-type: none"> ● El test de cilindro se realiza a cada animal: <ul style="list-style-type: none"> ○ Al menos un día antes de la inducción de la isquemia (test basal). ○ 7 ± 1 días después de la inducción de la isquemia. ○ 14 ± 2 días después de la inducción de la isquemia. ● El test se realizará durante el ciclo nocturno del animal. <p>Protocolo para la escala de Bederson:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Sujetando la rata por la cola se le deja la mitad superior del cuerpo apoyada en una superficie, se observa y se evalúa según el siguiente sistema de puntuación: <ul style="list-style-type: none"> ○ 0: sin déficit observable. ○ 1: pata delantera contralateral flexionada. ○ 2: resistencia consistentemente reducida al empuje lateral hacia el lado parético. ○ 3: el grado 2 más movimiento en círculos. ● El test de Bederson se realiza a cada animal: <ul style="list-style-type: none"> ○ Al menos un día antes de la inducción de la isquemia (test basal). ○ 7 ± 1 días después de la inducción de la isquemia. ○ 14 ± 2 días después de la inducción de la isquemia. ● El test se realizará durante el ciclo nocturno del animal. <p>Protocolo para la extracción y tinción del cerebro:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● A los 14 ± 2 días después de la inducción de la isquemia se decapita al animal bajo una profunda anestesia. ● Se extrae el cerebro, se coloca en una matriz de corte sumergida en PBS a 4 °C y se corta en secciones de 2 mm (este paso se ha de hacer dentro de los 10 min después de la decapitación). ● Se llevan los cortes directamente a TTC al 0,05% en PBS en una placa de fondo plano con tapa y se incuban durante 30 min a 37 °C en oscuridad, agitando suavemente cada 5 min. ● Se retira la solución de TTC y se lavan los cortes con tres cambios (1 min cada uno) de PBS. ● Se transfieren los cortes a formaldehído tamponado al 4% en una placa transparente de fondo plano sin arañazos y se fotografía con una escala al lado. <p>Desde el laboratorio coordinador se facilitará un enlace para recoger los datos de forma centralizada y visible a todos los participantes.</p>
<p>Criterios de inclusión y exclusión</p>	<p>Será motivo de exclusión un índice de lateralidad según el test del cilindro superior a 0.6 e inferior a 0.4 en el test basal. Se excluirán aquellas ratas con una puntuación diferente a 0 en el test de Bederson basal.</p>

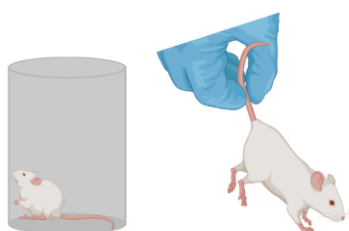
Resumen

Procedimiento completo

ESTABILIZACIÓN (al menos 1 semana antes de la inducción del modelo)



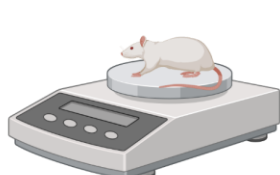
TEST BASALES (al menos un día antes de la inducción del modelo)



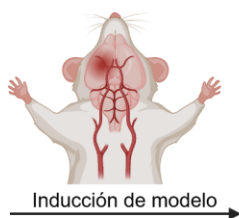
Test de cilindro

Test de Bederson

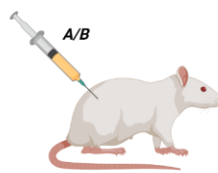
MODELO DE ISQUEMIA Y TRATAMIENTO



Pesar



Inducción de modelo



Administrar tto:

- Reperusión/60' después de oclusión
- 2 h
- 5 h
- 8 h

SEGUIMIENTO



Test de cilindro



Test de Bederson



Pesar

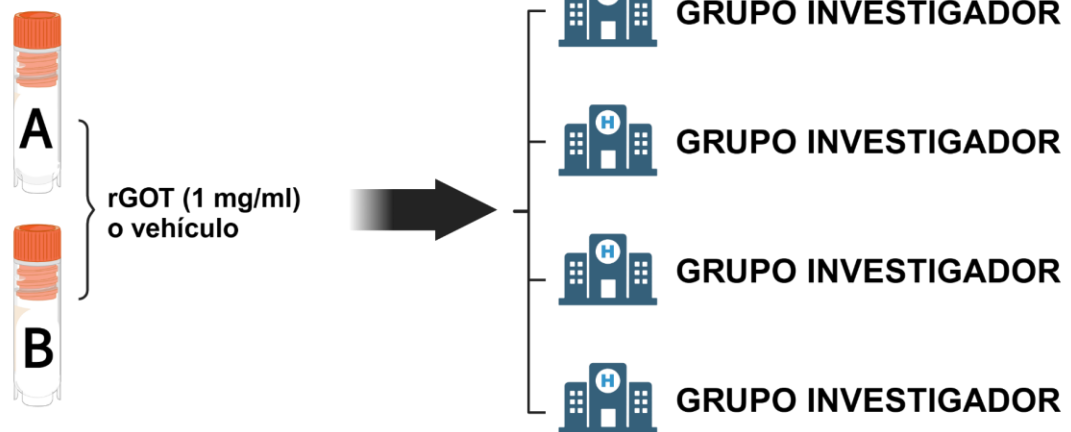
- 7 días
- 14 días

EXTRACCIÓN DEL CEREBRO Y TINCIÓN CON TTC



Aleatorización

GRUPO COORDINADOR



GRUPOS INVESTIGADORES

