

La asociación atorvastatina-meloxicam reduce el daño cerebral, atenuando la gliosis reactiva consecuente a embolismo arterial

Marcela Hernández¹, Lina María Trujillo¹, Ángel Enrique Céspedes^{1,2}

RESUMEN

Introducción: el accidente cerebrovascular es la primera causa de discapacidad y la tercera de muerte en Colombia y en el resto del mundo y está asociado a enfermedades mentales y neurodegenerativas.

Objetivo: determinar los efectos de la asociación atorvastatina-meloxicam sobre la gliosis reactiva en un modelo de isquemia cerebral por embolización arterial.

Materiales y métodos: se utilizaron 56 ratas *Wistar* macho adultas, distribuidas en cuatro grupos isquémicos y cuatro controles, además de otras 10 para determinar la distribución y extensión del infarto, induciendo lesión en seis de ellas y simulación (*sham*) en las cuatro restantes. Los tratamientos fueron: placebo, atorvastatina (ATV), meloxicam (MELOX) y ATV + MELOX en isquémicos y simulados. Veinticuatro horas después de la isquemia se evaluó la actividad enzimática mitocondrial con trifeniltetrazolio (TTC) y a las 120 horas, la reactividad astrocitaria (anti-GFAP), mediante inmunohistoquímica convencional.

Resultados: la asociación ATV+MELOX favoreció la modulación en la respuesta de los astrocitos protoplasmáticos y fibrosos del hipocampo y de la zona paraventricular, reduciendo su hiperreactividad. **Conclusión:** ATV y MELOX, aisladamente o asociados, reducen el daño cerebral atenuando la gliosis reactiva consecuente a la embolización arterial, lo que sugiere nuevos mecanismos de neuroprotección frente a la isquemia cerebral tromboembólica y abre nuevas perspectivas para su tratamiento temprano.

PALABRAS CLAVE

Astroglia; Atorvastatina; Gliosis; Isquemia Cerebral; Meloxicam; Tromboembolismo

¹ Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas (END), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

² Director del Laboratorio de Toxicología y Líder del Grupo de Investigación END. Docente investigador de planta de la Universidad del Tolima. Área de Neurobiología Celular y Molecular. Grupo de Neurociencias de Antioquia, Facultad de Medicina, Sede de Investigaciones Universitarias (SIU), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Correspondencia: Ángel Enrique Céspedes-Rubio. MSc., PhD. Barrio Santa Helena, Laboratorio 33-L101. Universidad del Tolima, Ibagué-Tolima (Colombia) Telefax (+578) 2771212 Ext. 9220; aecesped@ut.edu.co

Recibido: septiembre 19 de 2012

Aceptado: enero 28 de 2013

SUMMARY

The association atorvastatin-meloxicam reduces brain damage, attenuating reactive gliosis subsequent to arterial embolism

Introduction: Stroke is the leading cause of disability and the third of death in Colombia and in the world and it is associated with neurodegenerative and mental diseases.

Objective: To determine the effects of the atorvastatin-meloxicam association on reactive gliosis in a model of cerebral ischemia produced by arterial embolization.

Materials and methods: 56 adult male Wistar rats were used, divided into four ischemic and four control groups, plus 10 additional animals to determine the distribution and extent of infarction by injury in six of them and simulation (sham) in the remaining four. The treatments were: placebo, atorvastatin (ATV), meloxicam (MELOX) and ATV + MELOX in ischemic and simulated animals. 24 hours post-ischemia mitochondrial enzymatic activity was evaluated with triphenyl-tetrazolium (TTC), and at 120 hours astrocytic reactivity (anti-GFAP) was analyzed by conventional immunohistochemistry.

Results: The association ATV + MELOX favored the modulation of the response of protoplasmatic and fibrous astrocytes in both the hippocampus and the paraventricular zone by reducing their hypereactivity.

Conclusion: Atorvastatin and meloxicam, either individually or associated, reduce cerebral damage by lessening the reactive gliosis produced by arterial embolization; this suggests new mechanisms of neuroprotection against thromboembolic cerebral ischemia, and opens new perspectives in its early treatment.

KEY WORDS

Astroglia; Atorvastatin; Brain Ischemia; Gliosis; Meloxicam; Thromboembolism

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es el resultado de diversas lesiones que afectan la vasculatura del sistema nervioso y alteran el metabolismo neuronal.

La isquemia cerebral, que forma parte de la ECV, es la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad en Colombia y en el resto del mundo (1,2). Una sexta parte de la población mundial ha sufrido al menos una vez en la vida un episodio neurovascular y el 85% de estos son de tipo isquémico, por oclusión trombótica o embólica de la arteria cerebral media (ACM) o de una de sus ramas (3), lo que ocasiona cerca de 6.000.000 de muertes al año en el mundo (4). Los procesos fisiopatológicos desencadenados durante la isquemia cerebral afectan tanto neuronas como células gliales, llevan directamente a depleción energética y la consecuente necrosis (4) o a un estado con mínimo aporte de oxígeno y glucosa, que conduce a la apoptosis (5,6), o quizá desencadena otros mecanismos de muerte celular (3,7,8).

Respecto a los modelos para el estudio del infarto cerebral, se han descrito diferentes métodos de embolización con coágulos heterólogos, homólogos y autólogos; estos últimos se obtienen de la sangre del mismo individuo (9,10) y se preparan 24 horas antes de introducirlos en la arteria carótida interna para propósitos de embolización (11,12).

Entre las alternativas terapéuticas disponibles para el tratamiento de la isquemia cerebral se incluyen los agentes trombolíticos, los antiagregantes plaquetarios, los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (13) y diversos agentes neuroprotectores (14), que han tenido efectos significativos sobre la morbilidad y mortalidad consecuentes a la isquemia; sin embargo, no se ha logrado establecer un tratamiento eficaz que amplíe la ventana terapéutica y disminuya los efectos secundarios de algunos medicamentos (15). Si se tiene en cuenta que durante la isquemia cerebral se activan múltiples rutas de inflamación y muerte celular, una combinación de agentes terapéuticos podría maximizar el efecto neuroprotector (3,16,17).

La atorvastatina (ATV), un inhibidor de la 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA reductasa (3-HMG-CoA reductasa), ha demostrado tener efecto neuroprotector frente a la isquemia; en efecto, disminuye el daño neurológico, reduce el edema cerebral y el tamaño del infarto, promueve la recuperación sensitivo-motora, suprime la reacción inflamatoria aguda y el déficit funcional y modula proteínas implicadas en la plasticidad sináptica (14,18-22), aunque en la fase aguda puede alterar la función de la barrera hematoencefálica (BHE) (23).

A diferencia de otros tejidos, la COX-2 es una enzima constitutiva en el cerebro, fundamental en la plasticidad sináptica y en el acoplamiento neurovascular con algunas propiedades neuroprotectoras (24); el uso de fármacos inhibidores selectivos de la COX-2, como el meloxicam (MELOX), es beneficioso en episodios isquémicos, con menos efectos secundarios que otros antiinflamatorios no esteroides (AINE), y la asociación con otros medicamentos le confiere mayor protección (25,26).

En el presente estudio se evaluaron las características morfológicas de los astrocitos en el hipocampo y la zona paraventricular, tras la embolización arterial con coágulo autólogo, con base en la hipótesis de que la asociación de un inhibidor selectivo de la COX2 (meloxicam) y un inhibidor enzimático de la 3-HMG-CoA reductasa (atorvastatina) a dosis múltiple, reduce el daño neurológico postinfarto, modulando la reactividad de los astrocitos, acortando el tiempo de recuperación neurológica o reduciendo los efectos dañinos de la isquemia en etapas tempranas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 56 ratas *Wistar* macho de ocho semanas de edad y 235 gramos de peso promedio precedentes del Bioterio de Experimentación Animal de la Universidad del Tolima, y mantenidas bajo condiciones controladas de humedad relativa (60% a 80%), temperatura ambiente (22 +/- 1 °C), ciclos de luz: oscuridad (12:12 horas), alimento balanceado comercial¹ (15 g/rata/día) y agua de bebida acidulada *ad-libitum*. Los experimentos, fueron aprobados por el comité local de ética, siguiendo las normas internacionales de protección y manejo de animales de laboratorio (*Guide for care and use of laboratory animals*) y atendiendo a la ley 84 de 1989 de protección animal en Colombia.

El tamaño de la muestra se calculó con base en la fórmula: *tamaño de la muestra* = $n*(1/1-R)$, donde "n" corresponde al número de individuos requeridos sin pérdidas y R al porcentaje estimado de pérdidas. Se calculó un 25% de pérdidas, producto de la mortalidad intraoperatoria o posquirúrgica del modelo,

complicaciones que con frecuencia se presentan en el proceso de recuperación y fallas impredecibles en el procesamiento de los tejidos. Para este estudio, el tamaño de la muestra = $42*(1/1-0,25) = 56$.

Para las pruebas inmunohistoquímicas se emplearon 32 individuos, divididos aleatoriamente en ocho grupos experimentales (cuatro isquémicos y cuatro simulados). En los grupos isquémicos, se indujo quirúrgicamente la lesión cerebral por embolismo arterial con coágulos autólogos previamente preparados, y en los grupos simulados (*sham*), los animales se abordaron quirúrgicamente, pero no recibieron embolización, sino que se utilizaron como controles negativos de isquemia. Por otra parte, se utilizaron 10 animales adicionales, con el fin de determinar la distribución y la extensión del infarto a las 24 horas postisquemia, induciendo la lesión en seis de ellos y la simulación (*sham*) en los cuatro restantes.

Procedimiento quirúrgico

El protocolo para la preparación de los coágulos autólogos y la posterior embolización arterial se basó en técnicas previamente descritas (27,28) con algunas modificaciones. Se obtuvieron aproximadamente 400 μL de sangre por punción de la vena safena interna y se incubaron a 37 °C durante dos horas para retraer el coágulo y separar el suero; el coágulo se lavó y resuspendió en 500 μL de solución salina isotónica 0,9% N y se dejó en refrigeración a 4 °C por 24 horas. Antes de la cirugía, se fragmentaron los coágulos con pipeta Pasteur, hasta obtener microcoágulos de aproximadamente 25-50 μm , que pudieran pasar a través de un catéter de poliestireno PE50, y se resuspendieron en 500 μL de solución salina. Bajo anestesia general con una mezcla de ketamina (60 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) por vía intraperitoneal y sulfato de atropina (0,1 mg/kg) por vía subcutánea, se expuso la arteria carótida común (ACC) derecha mediante incisión cervical a nivel de la bifurcación en las arterias carótida interna (ACI) y carótida externa (ACE), se cauterizaron las ramas occipital, laríngea recurrente y tiroidea ascendente; la ACE se ligó y seccionó creando un muñón, se interrumpió temporalmente la circulación arterial pinzando en dos puntos (ACC y ACI) con pinzas microvasculares de aneurisma (*bulldog*). Mediante

¹ Rodentina* extrudizada -Agrinal Colombia S.A.

una microincisión en el muñón de la ACE se introdujo un catéter de poliestireno PE50, previamente cargado con 50 μL que contenían los microcoágulos resuspendidos en 100 μL de NaCl para un volumen total de 150 μL ; se avanzó cranealmente a lo largo de la ACI hacia la bifurcación en arteria cerebral media (ACM) y arteria cerebral anterior (ACA) a cuyo nivel se inyectaron los microcoágulos, para luego ligar alrededor del muñón de la ACE en el punto de inserción del catéter, con una sutura de polipropileno 4/0 (Prolene®), manteniéndolo en posición durante la embolización arterial. Se hizo una disección de la ACC izquierda (contralateral) y se bloqueó temporalmente el aporte sanguíneo. Se inyectaron lentamente los coágulos y luego de cinco minutos se retiró cuidadosamente el catéter y se ligó la ACE (polipropileno 4/0) permitiendo la reperfusión carotídea. Se retiraron las pinzas de aneurisma y se suturó la piel en un solo plano con nailon quirúrgico (prolene 4/0). La temperatura corporal se monitorizó con un termómetro rectal digital durante el intraoperatorio y los animales se colocaron en cajas de recuperación con agua y alimento *ad libitum*.

Tratamientos

Los grupos isquémicos tratados recibieron meloxicam, atorvastatina cálcica o una combinación de ambos disueltos en solución salina al 0,9% N a una concentración de 2,5 mg/mL para la ATV y de 0,4 mg/mL para el MELOX. Cada dosis se administró por sonda esofagástrica (*gavage*) en volumen de 2 mL a las 6, 24, 48 y 72 horas postintervención, a una posología de 10 mg/kg para la ATV y de 2 mg/kg para el MELOX. Los grupos simulados (*sham*) se trataron de igual forma que los isquémicos.

Obtención y preparación del tejido cerebral

Luego de 48 horas del último tratamiento, los animales fueron anestesiados con una mezcla de pentobarbital sódico al 6,48% (60 mg/kg) + xilacina al 2% (10 mg/kg) por vía intraperitoneal y sacrificados por exanguinación mediante punción cardíaca en el ventrículo izquierdo avanzando hacia la aorta ascendente. Se perfundieron los cerebros a presión positiva con 150 mL de solución salina seguidos de 200 mL de paraformaldehído buferrado (PFA) al 4%. Los cerebros fueron extraídos cuidadosamente y posijados en PFA a 4 °C durante 48 horas, sometidos a gradientes de sacarosa (7%, 25% y 30%) y

finalmente criopreservados a -20 °C en solución de etilenglicol/glicerol/PBS/agua (30:30:25:30 v/v), hasta cortarlos en vibrátomo (Vibratome® 1500) en secciones coronales de 50 μm de grosor.

Inmunohistoquímica

Se seleccionaron cortes coronales (- 2,2 a - 4,08 del bregma) para inmunohistoquímica convencional de acuerdo con el siguiente protocolo: lavado tres veces con tampón fosfato (PB 0,1 M, pH: 7,4) durante 10 minutos y tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% en una solución de metanol y PB 0,1 M (1:1 v/v) durante 20 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Luego de tres lavados con PB 0,1 M (10 minutos c/u), se preincubó con albúmina sérica bovina (BSA 1%) y Triton X-100 al 0,3% en PB 0,1M durante 60 minutos en agitación constante (*shaker*). Se incubó con el anticuerpo primario anti-GFAP (proteína ácida glial fibrilar) (1:500) en solución de incubación (BSA al 0,3% y Triton X-100 al 0,3% en PB 0,1M) durante 24 horas a 4 °C, en agitación constante. Luego de tres lavados consecutivos (PB 0,1M) los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* (1:250) por 60 minutos en agitación a temperatura ambiente (TA) y después de tres lavados con PB 0,1M (10 minutos c/u), se incubaron en avidina-biotina (1:250 para A y B) por 1 hora (TA) protegidos de la luz y en agitación constante. Se reveló con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) y 0,02% de H_2O_2 en PB 0,1M hasta que los cortes adquirieron un color marrón claro. Los cortes se montaron en láminas gelatinizadas, se secaron a TA por 24 horas y se sometieron a deshidratación por gradiente creciente de alcoholes (70%, 96%, 100%) y xileno; finalmente, se cubrieron con laminillas y sellante (*Consult mount*).

Extensión y distribución del infarto

Para determinar la distribución y extensión del infarto, se usó el colorante cloruro de trifeníl-tetrazolium (TTC) como indicador de la actividad enzimática mitocondrial (succinato-deshidrogenasa). Los animales fueron sometidos a anestesia con una mezcla de pentobarbital sódico (60 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal y perfundidos con 200 mL de solución salina; los cerebros se extrajeron y cortaron coronalmente en secciones de 2 mm de espesor, se incubaron en estufa (37 °C) durante 30 minutos en una solución de TTC (0,5%)

y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% siguiendo lo sugerido por otros autores (29,30).

Registro digital, densitometría y análisis estadístico

El marcaje inmunohistoquímico se registró fotográficamente en microscopio óptico (Motic BA210) y cámara digital (Moticam 2000). Las imágenes digitales se procesaron con *Fiji-Image J 1.45 software (NIH)* por análisis densitométrico y cuantificación en unidades relativas. Se hicieron análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple entre medias de tratamientos (Tukey), previa prueba de homogeneidad de varianzas y test de normalidad. Los datos se analizaron con el programa *GraphPad (Prism 7-5.0)*.

RESULTADOS

La embolización arterial genera isquemia en diversos territorios encefálicos

En el presente trabajo se reportan la distribución y extensión del infarto a las 24 horas de la embolización con microcoágulos autólogos. La mayor distribución ocurrió en la corteza cerebral, el cuerpo estriado medial y lateral, la zona paraventricular y el hipocampo ipsilaterales, con extensión mayor hacia el cerebro anterior y medio. Con la tinción de TTC se obtuvieron excelente contraste, definición y delimitación de las zonas infartadas con relación a las no afectadas (figura 1).

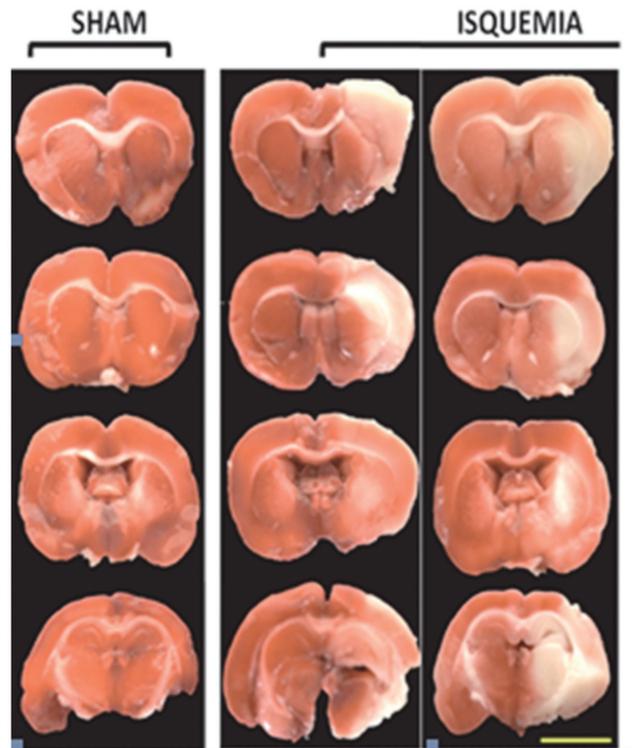


Figura 1. Determinación de la magnitud de la isquemia cerebral en un modelo de embolización arterial con coágulos autólogos en ratas. Tinción con cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) 24 horas postisquemia. Las secciones corresponden a cortes coronales sucesivos de 2 mm de grosor ordenados de anterior a posterior, representativos del grupo isquémico (n = 6) y el control (*sham* n = 4). El color rojo corresponde al tejido vital y el blanco, a las regiones afectadas por la isquemia. No se cuantificó el volumen de infarto debido a la distribución variable de las áreas infartadas. Barra de escala = 5 mm

La asociación atorvastatina/meloxicam reduce la gliosis cerebral reactiva

En la zona CA1 del hipocampo ipsilateral de los animales isquémicos se presentó una respuesta astrocitaria de tipo gliosis reactiva, a las 120 horas de practicada la embolización (figura 2-A2), caracterizada por un incremento en la densidad celular (GFAP-positivo), proliferación e infiltración de astrocitos protoplasmáticos y cambios morfológicos evidenciados como engrosamiento de los cuerpos celulares y acortamiento de las proyecciones astrocitarias (figura 2-C), en

comparación con los simulados no isquémicos (figuras 2-A1 y 2-B). ATV y MELOX, independientemente o asociados, redujeron significativamente la gliosis reactiva en la CA1 del hipocampo ($p < 0,001$) respecto al grupo isquémico placebo, sin mayores diferencias entre los tratamientos (figuras 2-A4, 2-A6, 2-A8 y 2-D); sin embargo, el MELOX por sí solo no logró modificar los cambios morfológicos ya descritos en los astrocitos reactivos protoplasmáticos (figura 2-A6), en tanto que la asociación ATV + MELOX redujo la respuesta astrocitaria retornando a un estado similar al de los controles no isquémicos (figura 2-A8).

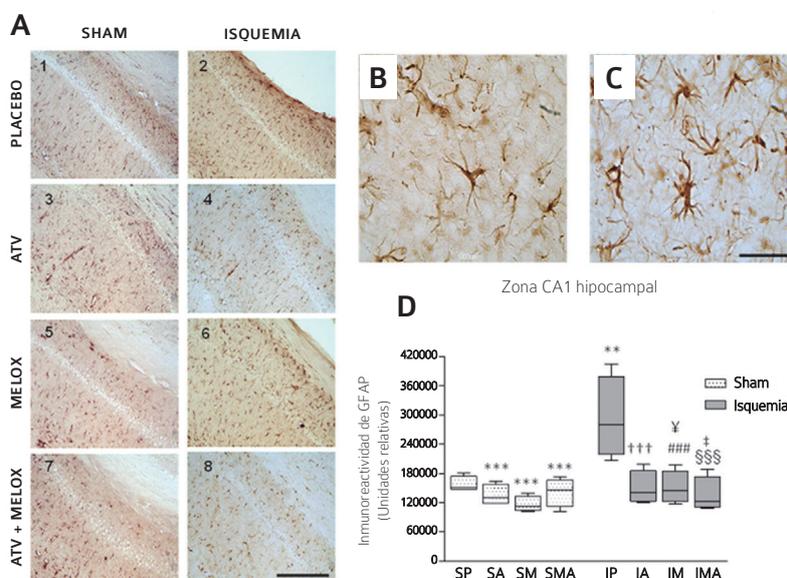


Figura 2. Disminución de la hiperreactividad astrocitaria en la zona CA1 del hipocampo, por la asociación de meloxicam y atorvastatina en isquemia cerebral por embolización arterial. Marcaje de astrocitos mediante inmunohistoquímica de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) en cortes coronales ipsilaterales representativos de la zona CA1 del hipocampo de animales sham (A-1, 3, 5 y 7) e isquémicos (A-2, 4, 6, 8) en el bregma -2,80 ($n = 4$). Efecto del tratamiento con meloxicam (2 mg/kg), atorvastatina (10 mg/kg) y su asociación (A-4, 6, 8 y D). Las microfotografías B y C corresponden a astrocitos (40X) típicos de un control no isquémico (sham) y uno isquémico sin tratamiento, respectivamente. Los datos estadísticos (D) se expresan como la media \pm DE en unidades relativas para ANOVA ($p < 0,05$) entre los grupos sham + placebo (SP), sham + atorvastatina (SA), sham + meloxicam (SM), sham + meloxicam + atorvastatina (SMA) y los grupos isquemia + placebo (IP), isquemia + atorvastatina (IA), isquemia + meloxicam (IM) e isquemia + meloxicam + atorvastatina (IMA). ** $p < 0,01$ frente a SP, *** $p < 0,001$ frente a IP, †††, ###, \$\$\$ $p < 0,001$ frente a IP, † $p < 0,05$ frente a IP, ‡ $p < 0,05$ frente a IP para la comparación múltiple entre medias de tratamientos (Tukey). Barra de escala = 100 μ m en A (10X) y 10 μ m en B y C (40X)

Por otra parte, el efecto de la isquemia y de los tratamientos sobre ella fue más evidente con el marcador de GFAP en la zona paraventricular (ZPV) correspondiente a la sustancia blanca, en donde la distribución

y morfología de los astrocitos fibrosos y radiales (figuras 3-B y 3-C) difiere sustancialmente de los protoplasmáticos (figuras 2-B y 2-C). Se observó un aumento marcado en la densidad de los astrocitos fibrosos

reactivos en los animales con isquemia + placebo (figura 3-B) e incluso en los isquémicos tratados con ATV + MELOX (figura 3-C) sin que se afecte la distribución de la proteína en las proyecciones astrocitarias y sin evidenciar formas aberrantes u otros cambios morfológicos.

Se observan diferencias muy significativas ($p < 0,001$) entre los controles positivos de isquemia (figura 3-A2) y el control negativo de la misma (figura 3-A1); además de la proliferación astrocitaria, se observan cuerpos celulares densos, francamente engrosados y con prolongaciones cortas pero ramificadas tanto en los isquémicos placebo como en los tratados con MELOX, ATV o su asociación (figura 3C). Los tratamientos con ATV y con la asociación de esta con MELOX redujeron significativamente ($p < 0,001$) la reactividad astrocitaria a las 120 horas postisquemia (figuras 3-A4, 3-A8 y D) llegando

a ser similares a los controles no isquémicos (figuras 3-A3, 3-A7 y D). Por el contrario, el solo tratamiento con MELOX no revirtió totalmente la gliosis reactiva y los astrocitos mantuvieron su morfología hipertrófica cuando se los comparó con los controles no isquémicos (figuras 3-A6 y 3-A5); sin embargo, el MELOX redujo significativamente ($p < 0,001$) la densidad global de los astrocitos reactivos (figuras 3-A6 y D) en comparación con los isquémicos que recibieron placebo (figuras 3-A2 y D). La hiperreactividad de los astrocitos en la ZPV de los animales isquémicos (figura 3-A2) fue muy significativa ($p < 0,001$) respecto de los controles no isquémicos (figura 3-A1) lo cual pone de manifiesto la marcada respuesta glial frente a la lesión; igualmente, la ATV, el MELOX y su asociación reducen a este tiempo postisquemia la gliosis reactiva inducida por el embolismo arterial.

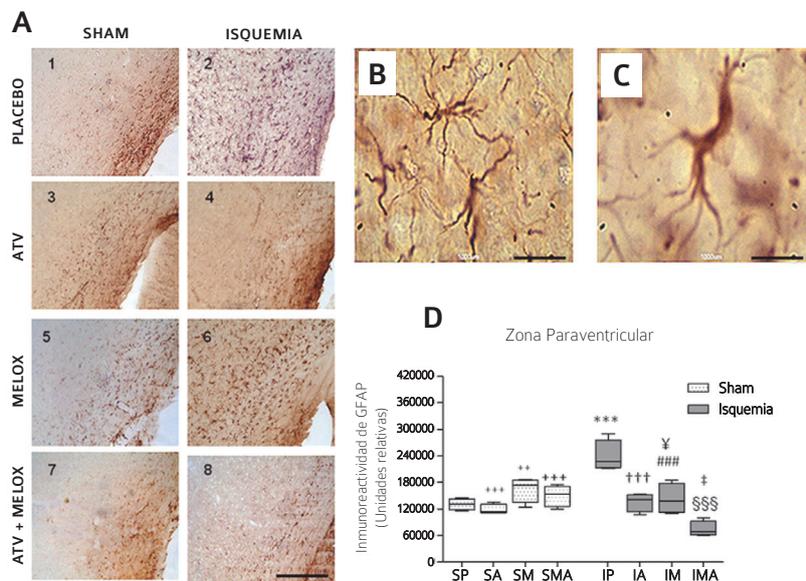


Figura 3. La atorvastatina y el meloxicam atenúan la gliosis reactiva consecuente a isquemia cerebral producto de embolismo arterial. Marcaje de astrocitos reactivos mediante inmunohistoquímica de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) en cortes coronales ipsilaterales representativos de la zona paraventricular (ZPV) de animales sham (A-1, 3, 5 y 7) e isquémicos (A-2, 4, 6, 8) en el bregma -4,08 ($n = 4$). Efecto del tratamiento con meloxicam (2 mg/kg), atorvastatina (10 mg/kg) y su asociación (A-4, 6, 8 y D). Las microfotografías B y C corresponden a astrocitos fibrosos (40X) típicos de un control positivo (isquemia + placebo) y uno isquémico con el tratamiento con la asociación atorvastatina + meloxicam, respectivamente. Los datos estadísticos (D) fueron analizados por ANOVA ($p < 0,05$) y se expresan como la media \pm DE de unidades relativas densitométricas para los grupos sham + placebo (SP), sham + atorvastatina (SA), sham + meloxicam (SM), sham + meloxicam + atorvastatina (SMA) y los grupos isquemia + placebo (IP), isquemia + atorvastatina (IA), isquemia + meloxicam (IM) e isquemia + meloxicam + atorvastatina (IMA). *** $p < 0,001$ frente a SP, *** $p < 0,001$ frente a IP, ** $p < 0,01$ frente a IP, †††, ###, \$\$\$ $p < 0,001$ frente a IP, * $p < 0,05$ frente a IP, † $p < 0,05$ frente a IP para la comparación múltiple entre medias de tratamientos (Tukey). Barra de escala = 100 μ m en A (10X) y 10 μ m en B y C (40X)

En algunos cortes de animales isquémicos que recibieron placebo así como en isquémicos tratados solo con MELOX se observaron astrocitos con formas aberrantes de cuerpos densos, prolongaciones cortas y fraccionadas (imágenes no mostradas) específicamente en ZPV mas no en CA1 del hipocampo, lo cual puede indicar daño grave de este tipo celular o un estado irreversible hacia la cicatriz glial en zonas de frontera cercanas a los ventrículos cerebrales.

DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la asociación ATV + MELOX ejerce un efecto modulador potenciado de la respuesta astrocitaria, mayor que el producido por la administración individual de los fármacos, manteniendo la morfología de los astrocitos protoplasmáticos y fibrosos en la CA1 del hipocampo y la ZPV, lo que sugiere nuevos mecanismos de neuroprotección frente a la isquemia cerebral tromboembólica.

Resultados similares se han reportaron en modelos focales en los que las áreas afectadas incluyen la corteza frontoparietal, el cuerpo estriado lateral y el hipocampo, a las 24 horas postisquemia/reperfusión (22,31), lo que ratifica la importancia del TTC para definir áreas de infarto con excelentes contraste, definición, extensión y delimitación de las zonas infartadas tanto en modelos monofocales (30) como multifocales o globales. En cuanto al modelo de isquemia cerebral por embolización con coágulos autólogos descrito en este trabajo, la extensión del infarto es mayor y en algunos casos prácticamente hemisférica (figura 1).

Se ha reportado inducción de daño oxidativo en un modelo de isquemia cerebral global transitoria, con sobreexpresión de COX-2, la cual juega un papel importante en el daño neuronal y los procesos de neurodegeneración, en tanto que los inhibidores de la COX-2 pueden tener un efecto protector en el daño cerebral (13,32). En un modelo de isquemia cerebral global a las 48 horas de la reperfusión, el tratamiento con meloxicam previno la reducción en los niveles de mRNA del receptor N-metil D-aspartato disminuyendo la respuesta inflamatoria (33).

En el presente trabajo se evidenciaron los tres tipos principales de astrocitos, tal como se los describe en la literatura, según su morfología y ubicación: 1) los astrocitos radiales que están en la superficie ventricular

y tienen brazos largos y no ramificados; 2) los protoplasmáticos con morfología arbustiva y numerosas prolongaciones cortas, ubicados en la sustancia gris en donde contactan muchas sinapsis y vasos cerebrales; y 3) los astrocitos fibrosos que poseen menos proyecciones más largas y sin ramificar, situados en la sustancia blanca, además de aquellos que se encuentran en la zona de frontera como la ZPV o cercanos a la barrera hematoencefálica, que pueden mostrar una morfología mixta intermedia entre los fibrosos y los protoplasmáticos (34,35).

En la presente investigación se encontraron formas aberrantes de astrocitos en el tejido isquémico, posiblemente relacionadas con un proceso de clasmotodendrosis, que se ha definido como un daño irreversible de los astrocitos a partir de una lesión cerebral; ello concuerda con lo reportado en estudios previos (36) en los que se describe una reducción significativa de las proyecciones astrocitarias con la subsecuente ruptura de las proyecciones distales (fraccionamiento) hasta la desintegración del cuerpo celular producto del fallo energético y la acidosis instaurada durante el evento isquémico.

En otro estudio de isquemia global transitoria, la proliferación astrogial se hizo evidente solo siete días después de la reperfusión, posiblemente porque los astrocitos protoplasmáticos (del hipocampo) no intervienen en las primeras etapas del episodio isquémico (37).

Quizás la hiperreactividad de los astrocitos protoplasmáticos en la CA1 del hipocampo esté relacionada con el efecto intrínseco del meloxicam o con un incremento en la captación del glutamato del medio extracelular por parte de los astrocitos, lo cual a su vez reduce la actividad del glutamato sobre los receptores neuronales y la posible excitotoxicidad. Por otra parte, el marcador de GFAP en animales isquémicos mostró astrocitos protoplasmáticos reactivos infiltrados en capas neuronales de la CA1, lo que concuerda con los resultados de estudios similares (38).

Los inhibidores de la COX-2 contribuyen al retraso en el progreso de la lesión cerebral después de una isquemia transitoria, mejorando el estado funcional; otros fármacos como la nimesulida no lograron reducir el daño en áreas subcorticales cuando se administró hasta 24 horas después de la isquemia (13).

Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran una marcada hiperreactividad astrocitaria en el grupo isquémico placebo similar a la de los isquémicos tratados con meloxicam; ello indica que el MELOX por sí solo no logra revertir totalmente el proceso de gliosis reactiva, aunque modula de alguna forma la hiperreactividad, al reducir significativamente la densidad global tanto en el hipocampo (CA1) como en la ZPV. Los cambios morfológicos de los astrocitos en la isquemia también revelan que el meloxicam no impide la progresión del daño astrocitario, lo cual se evidencia por el estado celular compatible con clasmatodendrosis (39).

La hiperreactividad astrogliar fue una de las constantes en el modelo isquémico por embolización arterial en la ZPV; estos datos son similares a los reportados en un modelo de isquemia focal transitoria (t-MCAO) en el que se obtuvieron lesiones reproducibles, caracterizadas por astrocitos reactivos en diversas áreas (22). También se ha demostrado que la GFAP incrementa su expresión en áreas perifocales indicando hiperreactividad consecuente al daño tisular cerebral (40,41).

Como se puede observar en nuestros resultados, los astrocitos reactivos en la isquemia se caracterizaron morfológicamente por aumento del tamaño (hipertrofia) y del número, así como por la extensión de sus prolongaciones, lo que concuerda con lo hallado en otros estudios (6); no obstante, los astrocitos reactivos producen metaloproteinasas que están implicadas en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular y que influyen en la arquitectura de la cicatriz glial después de una lesión (35), por lo cual es deseable ejercer cierta regulación o modulación frente a la hiperreactividad astrocitaria.

En cuanto al efecto de la asociación ATV + MELOX, se observó una reducción significativa en la reactividad astrocitaria tanto en la ZPV como en la CA1 del hipocampo; sin embargo, este efecto modulador de la respuesta astrogliar frente a la lesión se puede atribuir prioritariamente a la ATV, dado que por sí sola logró un efecto similar al de la asociación con MELOX, lo cual está de acuerdo con los resultados de otros estudios en los que se sugiere que la ATV confiere neuroprotección y favorece la plasticidad neuronal (18-20,22). Se puede deducir que en el hipocampo el tratamiento con ATV reduce la reactividad astrocitaria global, pero no hace revertir significativamente los

cambios morfológicos individuales de los astrocitos afectados por la isquemia. El MELOX, por su parte, reduce en menor grado la densidad global de los astrocitos hiperreactivos; sin embargo, los cambios morfológicos producidos por la isquemia se mantienen de forma similar a los isquémicos no tratados (placebo) lo cual parece obedecer a una clara señal de que se ha instaurado un proceso de excitotoxicidad (35).

CONCLUSIONES

A las 120 horas de la embolización arterial con coágulos autólogos, aumentaron el polimorfismo y la reactividad astrocitaria en la ZPV y en la zona CA1 del hipocampo, como respuesta al daño tisular.

La asociación de un fármaco como la atorvastatina, con propiedades neuroprotectoras demostradas, y un antiinflamatorio inhibidor selectivo, pero no específico, de la COX2 como es el meloxicam, atenúa la astrogliosis producto de la embolización arterial y supera los beneficios de los medicamentos individuales.

La terapia combinada con atorvastatina y meloxicam puede constituirse en una nueva alternativa de neuroprotección potenciada frente al infarto cerebral tromboembólico, reduciendo la pérdida neuronal mediante la modulación de la actividad metabólica astrocitaria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas y al Grupo Modelos Experimentales para las Ciencias Zoológicas de la Universidad del Tolima por el apoyo técnico y científico durante los experimentos, así como a los doctores Diego Piedrahíta y Fredy Castro, del Grupo de Neurociencias de Antioquia, por sus valiosos aportes científicos. Este trabajo fue financiado con recursos de la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico, juntamente con la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad del Tolima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taroco R, Fernández A, Vales V, Leizagoyen F, Devoto N. Ataque cerebrovascular (ACV) isquémico. Arch Med Interna. 2009;XXXI(Supl 1):S34-S45.

2. Ustrell-Roig X, Serena-Leal J. [Stroke. Diagnosis and therapeutic management of cerebrovascular disease]. *Rev Esp Cardiol*. 2007 Jul;60(7):753–69.
3. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 May;87(1):179–97.
4. Woodruff TM, Thundyil J, Tang S-C, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam T V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener*. 2011 Jan;6(1):11.
5. Castillo J. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Rev Neurol*. 2000;30(5):459–64.
6. Arango-Davila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H. [Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice]. *Rev Neurol*. 2004;39(2):156–65.
7. Culmsee C, Kriegstein J. Mechanisms of neuronal degeneration after ischemic stroke – emerging targets for novel therapeutic strategies. *Drug Discov Today*. 2005;2(4):463–470.
8. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1431–568.
9. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, et al. [Experimental models of cerebral ischemia]. *Rev Neurol*. 2008;47(8):414–26.
10. Rahimian R, Daneshmand A, Mehr SE, Barzegar-Fallah A, Mohammadi-Rick S, Fakhfoury G, et al. Tropisetron ameliorates ischemic brain injury in an embolic model of stroke. *Brain Res*. 2011 May 25;1392:101–9.
11. Roda JM, Carceller F, Pascual JM, Herguido MJ, González-Llanos F, Alonso de Leciana M, et al. [Experimental animal models in cerebral ischemia]. *Neurología*. 1998 Nov;13(9):427–30.
12. Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Høyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992 May;12(3):484–90.
13. Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*. 2004 May 8;1007(1-2):98–108.
14. Rabinstein AA. Statins prevent stroke recurrences... but can they improve stroke outcome? *Stroke*. 2009 Nov;40(11):3413–4.
15. Graham SH, Hickey RW. Molecular pathophysiology of stroke. *Neuropsychopharmacology: 1318 The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 1317–26.
16. Aldandashi S, Noor R, Wang CX, Uddin G, Shuaib A. Combination treatment with dipyridamole, aspirin, and tPA in an embolic model of stroke in rats. *Exp Neurol*. 2007 Jun;205(2):563–8.
17. Weng YC, Kriz J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2007 Mar;204(1):433–42.
18. Piernartiria T, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1–40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Experimental Neurology*. 210AD;226(2):274–84.
19. Yrjänheikki J, Koistinaho J, Kettunen M, Kauppinen RA, Appel K, Hüll M, et al. Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2005 Aug 9;1052(2):174–9.
20. Jung K-H, Chu K, Jeong S-W, Han S-Y, Lee S-T, Kim J-Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery, suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2004 Jul;35(7):1744–9.
21. Wang L, Zhang X, Liu L, Yang R, Cui L, Li M. Atorvastatin protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates HMGB1, HMGB1 receptors (RAGE and TLR4), NF- κ B expression. *Neurosci Lett*. 2010 Mar 8;471(3):152–6.
22. Céspedes-Rubio A, Jurado FW, Cardona-Gómez GP. p120 catenin/ α N-catenin are molecular targets in the neuroprotection and neuronal plasticity mediated by atorvastatin after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2010 Dec;88(16):3621–34.
23. Cui L, Zhang X, Yang R, Wang L, Liu L, Li M, et al. Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia: down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and cPLA2 expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res*. 2010 Apr 14;1325:164–73.

24. Choi S-H, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Apr;30(4):174–81.
25. Andreasson K. Prostaglandin signalling in cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol.* 2010 Jun;160(4):844–6.
26. Goncalves M, Williams E, Yip P. The COX-2 inhibitors, meloxicam and nimesulide, suppress neurogenesis in the adult mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2010;159:1118–25.
27. Hem A, Smith, Solberg P. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Animal.* 1998;32:364–8.
28. Beeton C, Garcia A, Chandu KG. Drawing blood from rats through the saphenous vein and by cardiac puncture. *J Vis Exp.* 2007 Jan;(7):266.
29. Benedek A, Móczik K, Jurányi Z, Gigler G, Lévy G, Hársing Jr L, et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research.* 2006;1116:159–65.
30. Joshi C, Jain S, Murthy P. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Research Protocols.* 2004;13:11–7.
31. Costain WJ, Rasquinha I, Sandhu JK, Rippstein P, Zurakowski B, Slinn J, et al. Cerebral ischemia causes dysregulation of synaptic adhesion in mouse synaptosomes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Jan;28(1):99–110.
32. Candelario-Jalil E, Mhadu NH, González-Falcón A, García-Cabrera M, Muñoz E, León OS, et al. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on cerebral infarction and neurological deficits induced by permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neuroinflammation.* 2005 Jan 18;2(1):3.
33. Montori S, Dos-Anjos S, Martínez-Villayandre B, Regueiro-Purriños MM, Gonzalo-Orden JM, Ruano D, et al. Age and meloxicam attenuate the ischemia/reperfusion-induced down-regulation in the NMDA receptor genes. *Neurochem Int.* 2010 Jul;56(8):878–85.
34. Lichtenstein M. Regulación de la plasticidad astrociaria por ibuprofeno y FGF2. Universidad Autónoma de Barcelona; 2011.
35. Lichtenstein M. Regulación de la plasticidad astrociaria por ibuprofeno y FGF2. Universitat Autònoma de Barcelona; 2011. p. 221
36. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Feb;23(2):137–49.
37. Li DR, Ishikawa T, Zhao D, Michiue T, Zhu BL, Wang HJ, et al. Morphological analysis of astrocytes in the hippocampus in mechanical asphyxiation. *Legal Medicine.* 2010;12:63–7.
38. Kato H, Takahashi A, Itoyama Y. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull.* 2003;60:215–21.
39. Zhang M, Li W, Liu Y, Liang J, Liu L, Cui X, et al. Neurochemistry International High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochem Int.* 2011;59(7):1019–1028.
40. Hulse RE, Winterfield J, Kunkler PE, Kraig RP. Astrocytic Glial Cell Maturation in Hippocampal Organ Culture. *Glia.* 2001;33(2):169–79.
41. Sager TN, Hansen AJ, Laursen H. Correlation between N-acetylaspartate levels and histopathologic changes in cortical infarcts of mice after middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(5):780–8.
42. Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* 2010;79:77–89.

