Multimed 2008; 12(1)

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
"CELIA SÁNCHEZ MANDULEY"
MANZANILLO - GRANMA

Cambios histológicos neuronales de la fascia dentada del hipocampo posteriores a isquemia cerebral permanente en Gerbils.

Neuronal histological changes in fascia dentata from hippocampus after a permanent brain ischaemia in Gerbils.

Madelin Hérriman Estrada[1]; Madeleyne González Broche[2]; Carmen Ferrer Magadan[3]
Misleidis Batista Vega[4]; Sara Roblejo Córcoles[5].

Resumen

Se realizó un estudio de tipo analítico comparativo con el objetivo de describir el comportamiento en el tiempo de la dinámica del daño neuronal posterior a un trauma isquémico permanente en poblaciones de neuronas de la Fascia Dentada del Hipocampo. Se escogieron 21 Gerbils de Mongolia entre 60 y 70 gr., machos. Se planificó la toma de 3 animales en cada tiempo, los cuales se anestesiaron y se les ligó la arteria carótida interna derecha. Se sometieron al sacrificio 3 ejemplares a las 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de producido el daño, se prefundió y se extrajo el cerebro para posteriormente procesarlo y obtener láminas histológicas teñidas con Hematoxilina- Eosina. Se realizó conteo celular por medio de la técnica morfoestereológica. Se hizo una división convencional en 2 zonas de la Fascia Dentada nombradas FDI y FD2. Se observó la dinámica de cambios morfológicos en el tiempo de los daños neuronales correspondientes a picnosis, cariorrexis y necrolisis como expresión máxima de daño en las zonas de la Fascia Dentada FD1 y FD2. En ambos campos estudiados las neuronas aparentemente sin daño se observaron desde el comienzo del estudio (2 horas) hasta las 6 horas. Las neuronas en cariorrexis presentaron una dinámica caracterizada por brusco ascenso en sus cifras que comienza desde las 4 horas y termina a las 48 horas, presencia de un pico máximo a las 12 horas y un brusco descenso hasta las 48 horas. Las neuronas en picnosis presentaron una dinámica caracterizada por incremento de sus cifras que aparecieron a las 2 horas en FD1 y a las 4 horas en FD2 hasta alcanzar un pico entre 12 y 24 horas y disminución a las 72 horas. Las neuronas en necrolisis aparecieron a las 12 horas, aumentaron progresivamente en el tiempo en ambos campos para alcanzar sus valores máximos a las 72 horas de producido el trauma. Se procedió a la comparación de ambos campos de estudio (FD1 y FD2), mediante la aplicación de pruebas de

significación estadística, considerándose como significativo un resultado correspondiente al 95% ($p<0.05$), es decir un nivel significativo del 5%. De esta forma se describió el comportamiento en el tiempo del daño isquémico permanente en poblaciones neuronales de la Fascia Dentada del Hipocampo. Finalmente se brindan las conclusiones y luego se sugieren recomendaciones en aras de perfeccionar el estudio realizado.

Descriptores DeCS: HIPOCAMPO/patología; GIRO DENTADO/patología; GERBILLINAE; MODELOS ANIMALES

Abstract

It was made a comparative analytical study with the objective of describing behavior in time of neuronal damage dynamics after a permanent ischaemic trauma in neuron populations from hippocampus Fascia Dentate. There were selected 21 male Mongolia gerbils from 60 to 70 grams. It was planned taking three animals each time, which were anesthetized, and it was tied right intern carotid artery. There was sacrified three of them at 2, 4, 6, 12, 24, 48, and 72 hours after damage was produced, it was perfunded, and brain was extracted to process afterwards for getting stained histological plate with hematoxilin-eosin. It was made cell count by means of morphoestereologic technique. It was made a conventional division into two zones of Fascia dentate called FD1 and FD2. It was noticed the dynamics of morphological changes in time of neuron damage corresponding to pyknosis, Karyorrexis, and necrolisis as maximal expression of damage in zones of Fascia Dentate FD1 and FD2. In both areas studied, neurons damageless were observed from the beginning of study (2 hours) to 6 hours. Neurons in Karyorrexis presented a dynamic characterized by rough exaltation in numbers beginning from 4 hours and finishing at 48 hours, presence of a maximum top at 12 hours and a rough descention till 48 hours. Neurons in pyknosis presented a dynamic characterized by an increase in numbers appearing at two hours in FD1, and at four hours in FD2 to get a top between 12 and 24 hours, decreasing at 72 hours. Neurons in necrolisis appeared at 12 hours, increasing progressively in time in both areas to reach maximum values at 72 hours from trauma production. It were compared both study areas (FD1 and FD2), by means of statistics significance test, taking as significative a result corresponding to 95% ($p < 0.05$), that is a significant level of 5%. This way it was described the behavior in the time of ischemic damage prevailing in neuronal populations from the hippocampus Dentate Fascia. Finally we reach conclusions and recommendations in honor of perfectioning this study.

Descriptores en Ingles: HIPPOCAMPUS/pathology; DENTATE GYRUS/pathology; GERBILLINAE; MODELS, ANIMAL

Introducción

El estudio del Sistema Nervioso Central ha sido objeto de experimentación desde épocas muy lejanas y diferentes entidades nosológicas que lo alteran significan afectaciones

invalidantes que comprometen el integro desarrollo biosicosocial de los seres humanos. Un ejemplo de estas afectaciones lo constituye la enfermedad cerebrovascular isquémica considerada como una de las 3 primeras causas de muerte en nuestro país y el mundo desarrollado y una de las primeras invalidantes (2).

Muchos estudios han centrado su interés en determinar como esta enfermedad se ha manifestado en diferentes áreas del encéfalo como corteza cerebral, tálamo e hipocampo, regiones donde se ha demostrado la vulnerabilidad de estas estructuras a la isquemia y para ello se han utilizado diferentes animales de experimentación entre los que se encuentra el Gerbils de Mongolia (3).

Por ser los accidentes vasculares encefálicos una de las primeras causas de muerte en nuestro país y en los 3 últimos años existir un incremento de esta enfermedad en 76,5%, por ser las neuronas en el Hipocampo las células más vulnerables a la isquemia cerebral y no existir descripción detallada en la literatura de las alteraciones morfológicas neuronales ante el insulto isquémico y por ser el Gerbils de Mongolia una especie en la que el sistema nervioso presenta similitud con otros animales de experimentación y carecer de un polígono de Willis completo que garantiza que el daño se focalice en un solo hemisferio al no recibir circulación colateral, nos encontramos ante el problema de contribuir a la descripción de los cambios cronológicos del daño neuronal luego del trauma isquémico en Fascia Dentada del Hipocampo en el biomodelo Gerbils de Mongolia.

Método

Se realizó un estudio analítico comparativo en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), en poblaciones de neuronas de los campos FD1 y FD2 de la Fascia Dentada del Hipocampo durante un trauma isquémico cerebral permanente unilateral provocado en el Gerbils de Mongolia, describiendo el comportamiento del daño neuronal en ambos campos en el tiempo.

Se realizaron las variables de tipo cuantitativas como: Poblaciones de neuronas aparentemente no dañadas, Poblaciones de neuronas en cariorrexis, Poblaciones de neuronas en picnosis, Poblaciones de neuronas en necrolisis.
Se utilizaron medidas de resumen para variables cuantitativas:

• Medidas de tendencia central: La suma (∑).

Se trabajó con el modelo de distribución t- Student.

Técnicas y procedimientos

Durante el estudio se escogieron Gerbils de Mongolia machos entre 60 y 70 gr. obtenidos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los animales se alojaron de forma individual con libre acceso al agua y alimento. Se estableció un ciclo de 12 horas alternas de luz oscuridad durante todo el período experimental.
Luego fueron anestesiados con Ketamina. Se expuso la carótida interna derecha en la zona anterior al cuello y después de ligarlas en puntos se cortaron con tijera o escarpelo. Se observó que no existiera sangramiento y luego se cerró la herida realizada en la piel por planos.

Sacrificio de Animales:

• A las 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 horas de la lesión se realizó perfusión con solución salina y solución de formalina, posteriormente se extrajo el encéfalo de cada animal y se procedió a su fijación y preparación de bloques de parafina para posteriores estudios histológicos. Se planificó la toma de 3 animales en cada tiempo. Total: 21.

Del procesamiento y análisis

Técnica histológica a utilizar: Para el estudio descriptivo histopatológico se utilizo:

• Técnica de Hematoxilina- Eosina.

Se obtuvieron láminas histológicas para visualizar los hemisferios cerebrales en cada Gerbils. Utilizando la Técnica morfoestereológica de conteo de puntos de Weibel se realizaron las respectivas mediciones celulares en la Fascia Dentada del Hipocampo. Con un lente objetivo de 40x y ocular 10x (amplificación 400x). El lente ocular contenía en su interior un retículo de 25 puntos equidistantes de forma tal que se pudieran realizar las determinaciones cuantitativas.

Selección de los campos microscópicos medidos

En cada lámina histológica se estudió el daño celular postisquemia a nivel de la Fascia Dentada del Hipocampo del Gerbils de Mongolia, se estudiaron 2 sectores elegidos convencionalmente por el autor para hacer más especifico y localizado el estudio. La Fascia Dentada se dividió en 2 zonas delimitadas al extender imaginariamente una línea que parte del extremo libre de la extremidad superior interna del Cuerno de Ammon y atraviesa la Fascia por su parte angulada obteniéndose una porción inferior que corresponde a FD2 y una superior que corresponde a FD1 situada entre los campos CA1 y CA4 del Cuerno de Ammon. En cada una se realizaron 7 observaciones, a partir de una distancia equivalente a 1/5 de la anchura del campo entre estas, medida en la zona FD1 a partir del área adyacente superior a la línea imaginaria en dirección al extremo libre de dicha zona y moviendo la lámina en una misma dirección para evitar el sesgo. En la zona FD2 se comenzó a realizar el primer conteo a partir del área adyacente inferior a la línea imaginaria en dirección al extremo libre de dicha zona y moviendo la lámina en una misma dirección. Se comenzaron a realizar las observaciones a partir de las regiones adyacentes a la línea imaginaria ubicada en la anulación de la Fascia en dirección a los extremos para de esta forma evitar un conteo erróneo invadiendo zona contraria. Cada lámina histológica corresponde a un Gerbils.

Se realizaron 14 observaciones por cada Fascia Dentada de cada Gerbils.
Se contaron los puntos que se superponen sobre cada elemento: neuronas aparentemente sin daño, neuronas en cariorrexis, neuronas en picnosis y neuronas en necrolisis.
Se consideró cualquier neurona incluida completamente en el retículo y aquellas que no estaban totalmente incluidas pero contactaban con la línea de puntos superiores o inferiores.
Se compararon ambos campos de estudio (FD1 y FD2) de la Fascia Dentada mediante la

aplicación de pruebas de significación estadística, considerándose como significativo un resultado correspondiente al 95% ($p<0.05$), es decir un nivel de significación del 5%.
La prueba de hipótesis utilizada fue la prueba de t de student de comparación de medias.

Prueba de Hipótesis

Hipótesis Nula (HO): Existen diferencias significativas en la manifestación de los cambios morfológicos postisquémicos en los campos FD1 y FD2 de la Fascia Dentada.
Hipótesis Alternativa (H1): Los cambios morfológicos postisquémicos en el tiempo se manifiestan de forma similar en los campos FD1 y FD2 de la Fascia Dentada.
La presentación se realizó a través de tablas y gráficos estadísticos.
El análisis y la interpretación se realizaron a través del método analítico comparativo.

Resultados

En el Gerbils de Mongolia la Fascia Dentada se presenta de forma de Herradura delimitándose un cuerno superior y uno inferior, cuya concavidad encaja en la porción inferior del Cuerno de Ammon... La forma organizativa de las neuronas de la FD es la tendencia a la formación de capas, dispuestas en hileras de 3, delimitadas por morfología y distribución.
Durante el transcurso del insulto isquémico provocado, las neuronas no dañadas se observaron entre las 2 y 6 horas luego de producida la lesión. En este período de tiempo se evidencia que inicialmente aparecen valores elevados en ambos campos más pronunciados en FD1.

En la tabla 1. Comportamiento de las neuronas no dañadas en el tiempo las células en cariorrexis aparecieron a las 4 horas de producida la isquemia localizándose aisladamente en FD1 intercaladas con las neuronas no dañadas. A las 6 horas comienzan a aparecer células en cariorrexis en FD2 y el daño se va haciendo creciente en el tiempo en ambas zonas hasta alcanzar un pico a las 12 horas, a partir de este momento comienzan a descender los valores para hacerse 0 a las 48 horas de ocurrida la isquemia, por lo que se comporta de forma similar en ambos campos.

En la tabla 2. Comportamiento de las neuronas en cariorrexis en el tiempo la dinámica de

la picnosis observada entre las 2 y las 72 horas se caracteriza por el aumento progresivo de las cifras hasta 12 y 24 horas en FD2 y FD1 respectivamente, para luego comenzar a descender hasta alcanzar valores mínimos a las 72 horas, significando que en este tiempo las imágenes de picnosis son muy aisladas.

La tabla 3: Comportamiento de las neuronas en picnosis en el tiempo la dinámica de las neuronas en necrolisis se realizó en un período de 12 a 72 horas observándose que en las 2 zonas el daño comienza a las 12 horas incrementándose en el tiempo, manteniéndose los mismos con las cifras mas elevadas a las 72 horas.

Discusión

En el gráfico 1. Comportamiento de las neuronas no dañadas en el tiempo con el transcurso del tiempo los gráficos tienden a disminuir haciéndose 0 en FD1 a las 6 horas y en FD2 a las 12 horas. Esta dinámica no es significativa estadísticamente al existir una $p<0.05$ con valor de 0,4187 lo que señala que ambos procesos aunque difieran gráficamente son semejantes con un 95% de confiabilidad.

En el grafico 2. Comportamiento de las neuronas en cariorrexis en el tiempo la dinámica de neuronas en cariorrexis observada después del trauma posee una zona donde se efectúa un pico localizado a las 12 horas, posterior al cual la observación de imágenes decae de forma brusca. En los inicios del estudio comienza el aumento, la cual se realizó también de forma brusca. Este comportamiento se manifiesta de forma semejante en ambos campos con $p<0.05$ con un valor de 0.0464 para un 95% de confiabilidad.

En el gráfico 3. Comportamiento de las neuronas en picnosis en el tiempo la dinámica de la picnosis experimenta un pico que desplaza entre las 12 y las 24 horas para FD2 y FD1 respectivamente para luego decaer hasta hacerse 0 a las 72 horas. Las células en picnosis comienzan a aparecer a las 2 horas para aumentar en el tiempo. Las curvas de ambos campos se comportan de una manera semejante, siendo la $p<0.05$ con un valor de 0.0182 lo que indica la existencia de diferencias en el comportamiento del daño entre los campos FD1 y FD2.

En el gráfico 4. Comportamiento de las neuronas en necrolisis en el tiempo la dinámica de la necrolisis mostrada en el grafico 4 es característica, comienza hacia las 12 horas

posterior al trauma, posee forma ascendente, todo el tiempo es en ascenso. En ambos campos el comportamiento es semejante, siendo la $p<0.05$ con valor de 0.0493.

Durante el transcurso del insulto isquémico cerebral en los campos FD1 y FD2 de la Fascia Dentada del Hipocampo no pudimos apreciar diferencias significativas relacionadas con las diferentes variantes de daño neuronal si consideramos que para un 95% de confiabilidad el valor de p fue inferior a 0.05, concluyendo la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en los campos estudiados, determinando que rechazaremos la hipótesis nula y aceptaremos la alternativa.

Por lo expuesto posteriormente se demostró que el proceso de daño neuronal se comportó de forma similar durante el transcurso del tiempo en los campos descritos y se harán mas evidentes en la medida que el daño sea más agresivo y perdurable.

Conclusiones

1. En los campos FD1 y FD2 de la Fascia Dentada del Hipocampo existe daño irreversible posterior a trauma isquémico permanente caracterizado por imágenes de necrosis que presentan una dinámica semejante entre ambos campos hasta las 72 horas en los Gerbils de Mongolia.

2. En ambos campos estudiados las neuronas aparentemente sin daño se observaron desde el comienzo del estudio (2 horas) hasta las 6 horas.

3. Las neuronas de Cariorrexis presentaron una dinámica caracterizada por brusco ascenso en sus cifras que comienza desde las 4 horas y termina a las 48 horas, presencia de un pico máximo a las 12 horas y un brusco descenso hasta las 48 horas.

4. Las neuronas picnosis presentaron una dinámica caracterizada por incremento en sus cifras que aparecieron a las 2 horas en FD1 y a las 4 horas en FD2 hasta alcanzar un pico entre 12 y 24 horas y disminución a las 72 horas.

5. Las neuronas en Necrolisis aparecieron a las 12 horas, aumentaron progresivamente en el tiempo en ambos campos para alcanzar sus valores máximos a las 72 horas de

producido el trauma.

6. La división convencional de la Fascia Dentada en FD1 y FD2 no tiene significación pues el comportamiento de los daños en ambas zonas son similares.

Recomendaciones

1. Hacer extensiva esta investigación al estudio de poblaciones neurogliales y de fibras nerviosas en el hipocampo, así como en otras estructuras cerebrales vulnerables a la hipoxia.

2. Cuando se administre una molécula que presente efecto neuroprotector hay que tener en cuenta que los cambios que se experimentan son irreversibles, esto pueda tener importancia en que se detenga el proceso pero no se revierta, por lo que un tratamiento eficaz debe ser realizado con mayor brevedad posible.

3. Incluir el presente material en la página Web de nuestra Universidad para que constituya un artículo de consulta para profesionales de la salud.

4. Perfeccionar la técnica de morfometría, utilizando otras opciones que nos brinda la misma para continuar el trabajo.

Referencias Bibliográficas

1- Marston JH. The ufaw handbook on the care and managment of Laboratory Animals. 5 ed London: Churchill Livingston, 2000: 263 -74.

2- Boletín de la OMS. Nº. 234. Oficina OPS. Ciudad Habana, Cuba 2000.

3- Bonnekoh P.Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes alter 5 minute ischemia and long survival times. Acta Neuropathol. 1990; 80: 18-25.

4- Yamamoto J. Ultraestructural investigation of the CA region of the hippocampus after trasient cerebral ischemia in Gerbils. Acta Neuropathol. 2002; 80(5): 487.

5- Mickel K. Prominent white mather lesion develop in Mongolian gerbils treted with 100% normobaric oxygen after global brain ischemia. Acta Neuropathol. 2000; 70(5): 465.

6- Castro A, Foyo E, Perez U, Garcia J, Grijalva I. Comunicación arterial carotidobasilar en gerbos (Meriones unguiculatus). Rev. Neurol. 2001; 32: 225-228.

7- Yamada KA. New modelo f trasient hindbrain ischemia in Gerbils. J Neurosurg. 04; 60: 1054-8.

8- Norris ML, Adams CE.Suppression of aggresive behaviour in the Mongolian gerbiis (Merione unguiculatus). Lab Anim; (6): 695-9.

9- Sherardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T. 2,3- dhydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. Science. 2000; 247: 571-574.

10- Kirino T, Tamura A, Sanpo K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Prog Brain Res 2005; 63: 39-58.

11- R. Truex;M.B. Carpenter Neuroantomia humana. La Habana: Edición revolucionaria-3 ed en español, tomada de la 5.ed inglesa. 1971.

12- E. Estrada; J. Perez. Neuroanatomía funcional 3 reimp.- (La habana): Ed revolucionaria, 1972-p. 324, 327, 241,342, 346-347.

13- R.H. Corrtach. W. Cowman Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat F:Normal estructure with special reference to synaptic organization.-I. Comp. Neur 128: 359- 396. 1966.

Anexos

Tabla 1. Comportamiento de las neuronas no dañadas en el tiempo

Horas	FD1 Normal	FD2 Normal
2	53	37
4	35	27
6	0	7
12	0	0
24	0	0
48	0	0
72	0	0

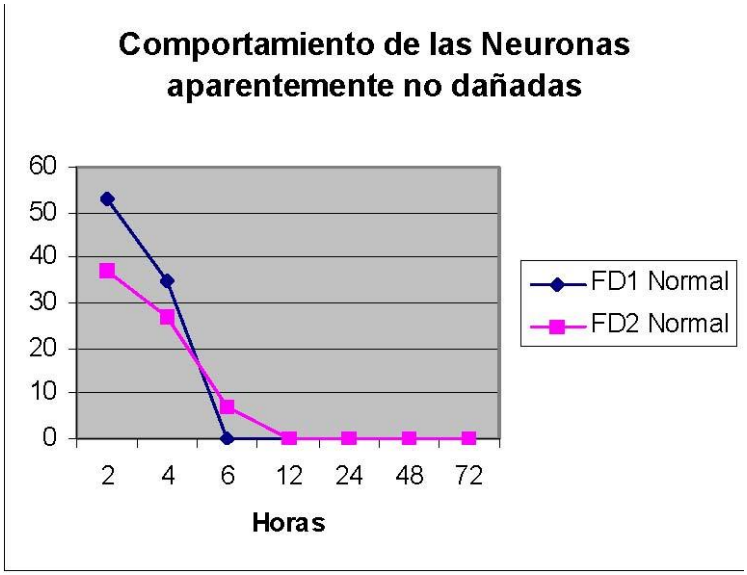


Tabla 2. Comportamiento de las neuronas en cariorrexis en el tiempo.

Horas	FD1 Cariorrexis	FD2 Cariorrexis
2	0	0
4	3	0
6	19	18
12	28	30
24	23	18
48	18	6
72	0	0

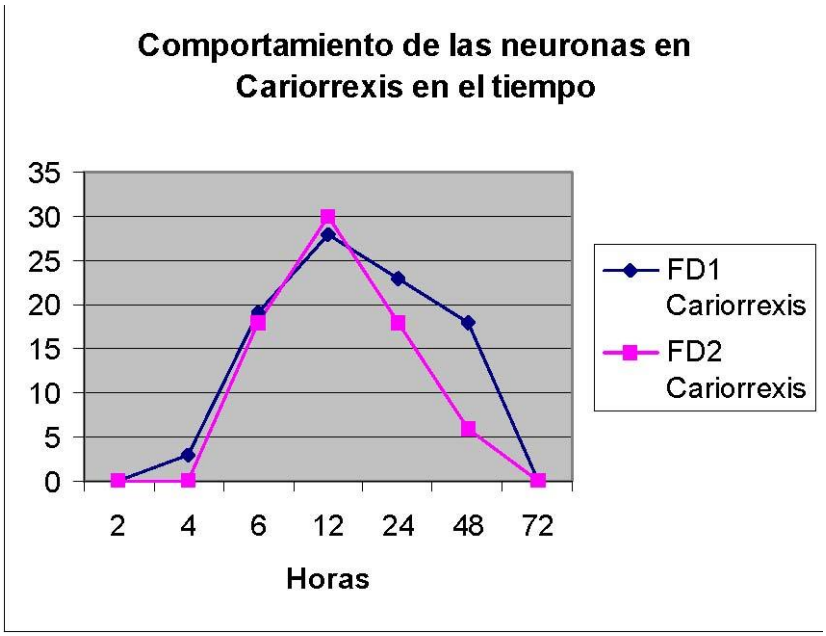


Tabla 3. Comportamiento de las neuronas en picnosis en el tiempo.

Horas	FD1 Picnosis	FD2 Pignosis
2	3	0
4	26	6
6	32	18
12	39	39
24	41	30
48	33	19
72	7	5

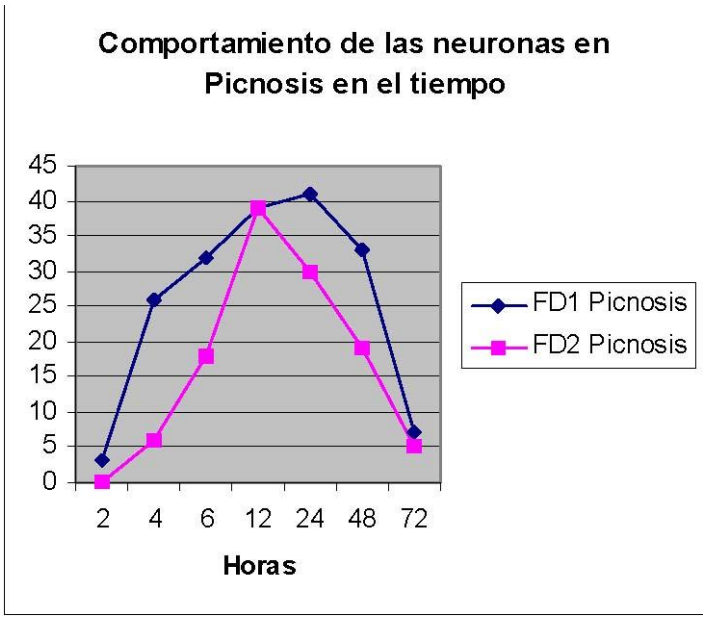
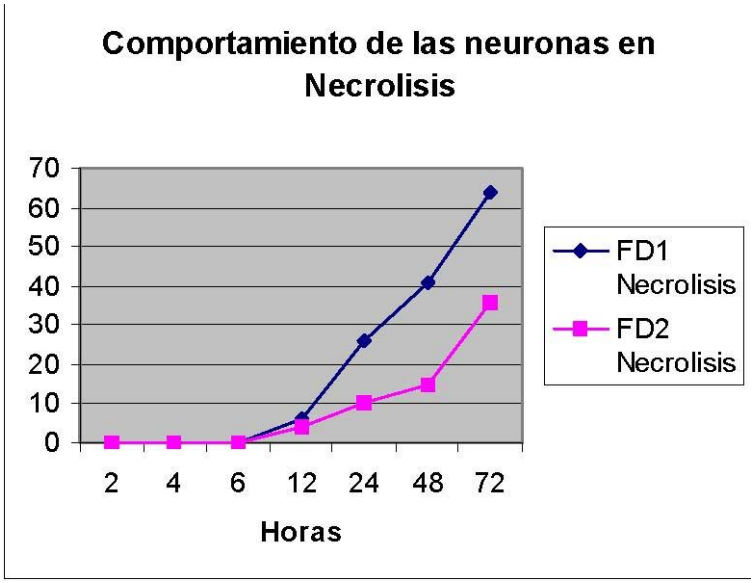


Tabla 4. Comportamiento de las neuronas en necrolisis en el tiempo.

Horas	FD1 Necrolisis	FD2 Necrolisis
2	0	0
4	0	0
6	0	0
12	6	4
24	26	10
48	41	15
72	64	36



[1] Especialista de I grado en Medicina General Integral
[1]Especialista de I grado en Medicina General Integral
[1]Especialista de I grado en Medicina General Integral
[1] Especialista de I grado en Medicina General Integral
[1]Especialista de I grado en Medicina General Integral