



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Protocolo de proyecto de investigación para el Servicio Social:

“Evaluación del anestésico idóneo en la generación de un modelo de la enfermedad de Huntington, inducido con ácido quinolínico en ratones C57BL6/J”

Elaborado por:

Carlos David García Zárate

Matrícula:

2202034206

Asesora interna:

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera.

Asesora Externa:

Dra. Francisca Pérez Severiano.

Introducción:

La enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es una patología neurodegenerativa con herencia autosómica dominante descrita por George Huntington en 1872. El comienzo de la enfermedad se sitúa en la edad media de la vida, habitualmente entre los 30 y 50 años. La EH se caracteriza por movimientos musculares anormales (normalmente movimientos coreicos), alteraciones emocionales y deterioro progresivo de funciones cognitivas, que conducen a la muerte en 10 a 15 años (Gourfinkel-An, *et al.*, 1997; Zeron *et al.*, 2002; Serrano, *et al.*, 2011).

La EH es derivada de la pérdida de la actividad normal de la proteína huntingtina (Htt) debido a una mutación en el primer exón del brazo corto del cromosoma 4 del gen que la codifica (Martínez, 2023; Saavedra, 2023). La huntingtina mutante (Httm) resulta de una expansión anormal de repeticiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) que codifican un tramo de poliglutamina (poliQ) en la región N-terminal de la proteína Htt. (Auerbach *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002). La Htt normal (<36 CAG) regula el transporte anterógrado y retrógrado de vesículas endocíticas al interactuar con varios mediadores de tráfico celular. La Htt normal es mayoritariamente citoplasmática, y está presente en los núcleos de las neuronas, las dendritas y las terminales axónicas, y en cantidades más pequeñas, en múltiples compartimentos subcelulares, e interfiere con múltiples vías celulares interactuando con más de 200 proteínas; por lo que las interacciones anormales de la Httm (Mayor a 37-250 CAG) con proteínas podrían, en parte, mediar su toxicidad evocando defectos en la dinámica mitocondrial y el tráfico de orgánulos, lo que, a su vez, podría provocar una falla bioenergética llevando a una disfunción neuronal y muerte celular (Li & Li, 2004; Sugars *et al.*, 2003; Bossy-Wetzel *et al.* 2008).

Desde el punto de vista patológico, la característica temprana más evidente, es una atrofia macroscópica marcada del neostriado con degeneración neuronal concomitante dentro del núcleo caudado y el putamen que suele ir acompañada de pérdida de células en la corteza cerebral, y atrofia cerebral generalizada (Menalled *et al.*, 2002; Ferrante, 2009). Sin embargo, no todas las neuronas se ven afectadas por igual dentro del neostriado. El sello distintivo de la neuropatología en la EH es la neurodegeneración selectiva de las neuronas de

proyección espinosas de tamaño mediano con abundantes receptores para N-metil D-aspartato (NMDA), que constituyen aproximadamente el 90% del contenido de neuronas estriatales, las cuales se ven afectadas desproporcionadamente de manera temprana y más grave (Ferrante, 2009; Saavedra, 2023).

En la EH se han encontrado alteraciones en las concentraciones de diversos neurotransmisores en varias zonas cerebrales, específicamente en el cuerpo estriado, se ha demostrado un descenso significativo en las concentraciones del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), acetilcolina, sustancia P y dinorfina mientras que el contenido de somatostatina y neuropéptido Y, está aumentando. Estos cambios reflejan el grado de afectación de los diferentes tipos celulares responsables de la síntesis y liberación de esos neurotransmisores (Bonilla, 1987).

El término excitotoxicidad fue acuñado para describir la excitación neuronal excesiva por el transmisor glutamato, lo que resulta en estrés celular o muerte debido al influjo de sodio, calcio y agua (Rothman & Olney, 1995). En condiciones fisiológicas, la liberación de glutamato inducida por el potencial de acción, media la despolarización rápida de las membranas neuronales al activar los receptores ionotrópicos (NMDA, entre otros) en las espinas dendríticas o los sitios de liberación de neurotransmisores presinápticos. La acumulación de glutamato debido a una estimulación excesiva o una captación disminuida también puede activar los receptores extrasinápticos en los ejes dendríticos o el soma celular. Debido a propiedades como alta permeabilidad al calcio, gran conductancia de canal único y cinética lenta de desensibilización y cierre de canal, los receptores NMDA juegan un papel importante en la excitotoxicidad (Rothman & Olney, 1995; Raymond, 2003; Dingleline et al., 1999).

Existe evidencia que sugiere que los procesos excitotóxicos y el estrés oxidante están involucrados en la etiología de la EH, en donde la muerte celular excitotóxica está mediada por la liberación de glutamato de las aferencias corticales y la activación de los receptores a NMDA. Las lesiones excitotóxicas del cuerpo estriado, típicamente generadas por una activación más selectiva de los receptores NMDA en animales, producen efectos que se asemejan a los cambios neuropatológicos y neuroquímicos de la EH (Cepeda et al., 2001; Zeron et al., 2002; Martínez, 2023).

Modelos experimentales generados para el estudio de la EH

Si bien se han logrado grandes avances en la comprensión de la patogénesis de la EH, aún no se conocen completamente los mecanismos de la enfermedad. Los modelos que emplean excitotoxinas y los modelos genéticos que imitan de cerca los síntomas neurobiológicos y clínicos de la enfermedad pueden proporcionar un enfoque alternativo para el estudio de la patogénesis molecular de la EH y para el desarrollo de tratamientos existentes y nuevas estrategias terapéuticas. Por lo tanto, los modelos animales son una parte crucial de este campo de investigación de la EH que avanza rápidamente (Ferrante, 2009).

Modelos que emplean excitotoxinas

Uno de los primeros modelos experimentales de EH se estableció en ratas y ratones e incluyó la introducción directa de agonistas excitatorios en el sistema nervioso central (Ferrante, 2009). Se demostró que la inyección en ratas de la neurotoxina excitatoria de tipo glutamato, el ácido kainico, produjo una degeneración de las neuronas de proyección GABAérgica y colinérgica del estriado, con conservación de las neuronas dopaminérgicas. La actividad de algunas enzimas como glutamato descarboxilasa y colina acetil transferasa, disminuyeron de forma similar a lo encontrado en la enfermedad. Sin embargo, a diferencia de la EH, se observó disminución significativa en los niveles de somatostatina y neuropéptido Y (Coyle y Schwarcz, 1976; Sánchez et al., 2011). Este modelo se refinó utilizando excitotoxinas de tipo NMDA, incluido el ácido quinolínico (AQ), un intermediario endógeno en la vía de la kinurenina del metabolismo del triptófano, el cual se encuentra en niveles elevados en pacientes con EH que posiblemente se deban a la microglía activada lo que resulta en neurodegeneración (Ferrante, 2009; Vernau, 2008; Lovelace et al., 2017). A diferencia del ácido kainico, el AQ muestra una tolerancia diferencial a las neuronas estriatales, dañando tanto a las neuronas GABAérgicas como a las que contienen sustancia P, con una tolerancia relativa a las neuronas NADPH-diaforasa y colinérgicas, que se sabe que no sufren la EH (Ferrante, 2009). El modelo murino de la EH inducido por la administración intraestriatal de AQ en ratones, reproduce la citotoxicidad que se observa en pacientes con la enfermedad (Cepeda et al., 2001; Schwarcz et al., 1983). Dicho modelo permite mostrar una conducta de giros en los ratones inducidos por la administración de apomorfina, debido a la muerte neuronal asociada a la afinidad del AQ al receptor NMDA (Schwarcz et al., 1983).

La conducta de giros se encuentra regulada por la liberación del neurotransmisor GABA de las neuronas en el estriado, una menor liberación de este neurotransmisor se asocia con la falta del control del movimiento en dicha estructura. La apomorfina es un fármaco agonista de los receptores D2, incrementa la liberación de dopamina, siendo este un neuromodulador de las transmisiones neuronales relacionada al control de la función motora, mediando la conducta de giro ipsilateral observada en dicho modelo (Martínez-Gopar, 2023).

Existen otros modelos animales de la EH en donde la administración sistémica de toxinas o inhibidores mitocondriales también imita la neuropatología (disfunción mitocondrial) y trastornos del movimiento presentes en la EH (Browne, 1997). El mecanismo primario que subyace la toxicidad estriatal con 3-NP es la inhibición selectiva de la actividad de complejo II de la cadena respiratoria, es decir, de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que se encuentra constantemente reducida en el núcleo estriado de pacientes con EH (Vázquez, 2016).

Modelos modificados genéticamente

La EH se caracteriza por su aparición tardía, por lo que reproducir el fenotipo humano de la EH durante la vida de un ratón representa un gran desafío (Ehrnhoefer et al., 2009) Actualmente, un ratón se califica como un modelo transgénico de la EH si lleva un fragmento (R6/1 y R6/2) o la longitud completa (YAC46 y YAC72) del gen Htt patológico humano insertado aleatoriamente dentro de su genoma, impulsado así por promotores variables que expresan la Httm generalmente además de su propio tipo silvestre, El modelo R6/1 lleva 115 repeticiones CAG mientras que el modelo R6/2 tiene 145 repeticiones CAG, siendo así que el modelo R6/2 muestra un fenotipo más agresivo que el modelo R6/1. Los ratones YAC46 y YAC72 que expresan Httm con 46 y 72 repeticiones CAG respectivamente, fueron hasta cierto punto representativos de la enfermedad humana, mostraron alteraciones electrofisiológicas tempranas seguidas de degeneración selectiva de neuronas espinosas medianas junto con algunas alteraciones en el comportamiento y la actividad motora (Vonsattel, 2008; Stricker et al., 2018).

Por otro lado, un ratón se considera un modelo *knock-in* si lleva un fragmento o una longitud completa del gen Htt patológico humano insertado dentro de su propio gen Htt. Por lo tanto, en este modelo, el promotor natural del ratón impulsa el gen extraño que expresa el tracto de

poliglutamina expandido. En resumen, un ratón al que se hace referencia como modelo de la EH es un ratón cuyo genoma incluye sólo un fragmento o la longitud completa del gen humano que codifica la Httm que desencadena o causa la enfermedad (Ehrnhoefer et al., 2009; Vonsattel, 2008; Stricker et al., 2018).

Consideraciones metodológicas para ensayos terapéuticos en ratones

El desarrollo de modelos animales *in vivo* para la EH, ha contribuido en gran medida a nuestra comprensión del mecanismo de daño de esta y las vías moleculares y celulares que impulsan la patogénesis (Kaye et al., 2021). Como el modelo excitotóxico de la EH es un modelo invasivo que causa mayor dolor en los animales, se procede de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana- NOM-062-ZOO-1999 se requiere el uso de tranquilizantes, analgésicos o anestésicos.

Sedantes y anestesia

Los fármacos sedantes-hipnóticos deprimen el SNC de una manera que depende de la dosis, produciendo en forma progresiva una gama de respuestas que van desde la sedación leve hasta el coma y la muerte. Un fármaco *sedante* disminuye la actividad del cerebro y médula espinal, modera la excitación y calma al individuo que lo recibe (*Goodman & Gilman*, 2015).

Los barbitúricos en un tiempo se utilizaron ampliamente como fármacos sedantes-hipnóticos como el Sedalparma® (Pentobarbital sódico), su mecanismo de acción radica en la unión con un sitio alostérico en el receptor GABA_A distinto al sitio de la benzodiazepina (Figura 1). El pentobarbital sódico intensifica la transmisión inhibitoria mediada por GABA en todo el SNC y pueden producir todos los grados de depresión del SNC, sin embargo, deprimen tanto el estímulo respiratorio como los mecanismos que mantienen el carácter rítmico de la respiración (Nestler, et al. 2015; *Goodman & Gilman*, 2015). Con excepción de algunas aplicaciones especializadas, los barbitúricos en gran parte han sido reemplazados por las benzodiazepinas, como el Zolazepam, ya que los efectos colaterales cardiovasculares y respiratorios son menores y que de igual manera actúan en los receptores GABA_A al unirse de manera directa con un sitio específico distinto al sitio de unión a GABA (Wilson et al., 1993; *Goodman & Gilman*, 2015).

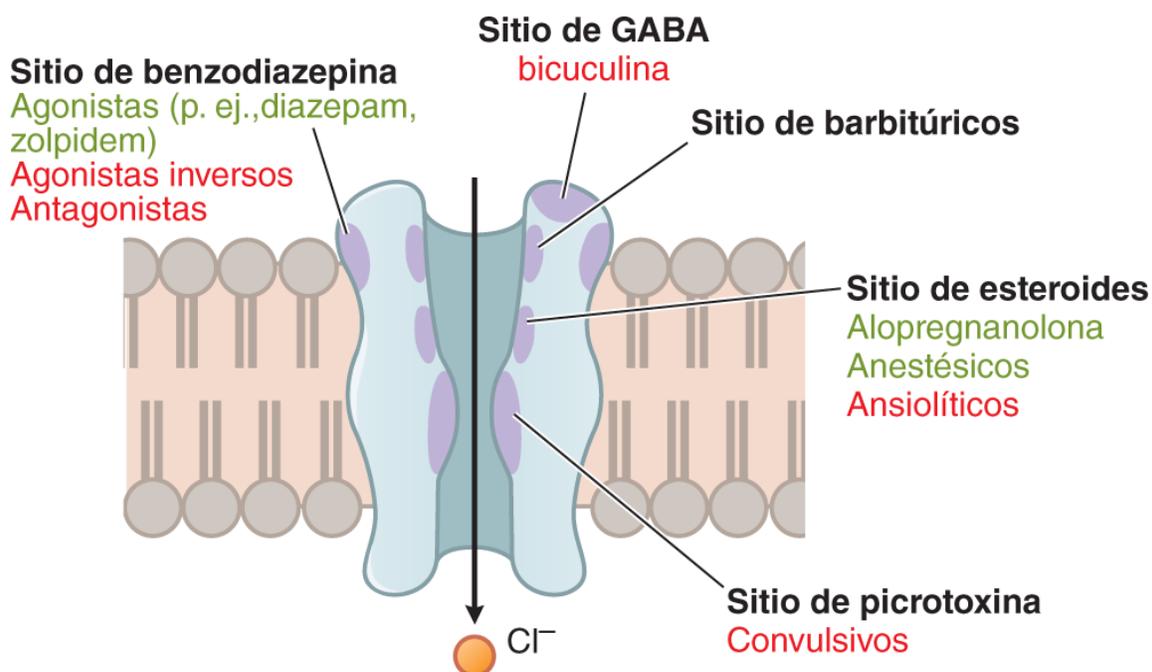


Figura 1. Sitios de unión con fármacos del receptor GABA_A. GABA se une en el sitio ortostérico del receptor GABA_A. Otros sitios señalados son de naturaleza moduladora, en los cuales los agonistas o antagonistas alostéricos pueden fomentar (verde) o inhibir (rojo) la función del receptor. Fuente: *Goodman & Gilman*, 2015.

No obstante, entre los anestésicos en venta para uso veterinario se encuentra el Zoletil® 100, es una combinación de Tiletamina y Zolazepam, que genera un efecto anestésico con alto margen de seguridad. La Tiletamina es un agente anestésico disociativo que pertenece a la categoría de antagonistas del receptor NMDA. La tiletamina es químicamente similar a otro anestésico disociativo como la ketamina, ampliamente utilizada para anestesia en animales (Hubbell, et al., 1989; Wilson et al., 1993).

En la actualidad, la presencia de los barbitúricos como psicofármaco es bastante testimonial, en comparación a su época de mayor popularidad. Ello se debe a que han sido desplazados por la benzodiazepina y las leyes han restringido mucho su uso público y experimental, en este contexto, existen anestésicos alternativos permitidos para uso veterinario como el Zoletil® 100 ya que son menos invasivos y más seguros (Mayer & Mans, 2018).

Planteamiento del problema y justificación

Actualmente, el procedimiento de cirugía estereotáxica en el cerebro de animales, y especialmente en roedores, se encuentra difundida en el campo de las neurociencias, dada la posibilidad de manipular diversas estructuras cerebrales causando mínimas lesiones parenquimatosas. El modelo murino de la EH inducido por la administración intraestriatal de AQ en ratones, reproduce la excitotoxicidad que se observa en pacientes con la EH y en este modelo se observan cambios conductuales y motores (Cepeda et al., 2001; Schwarcz et al., 1983). Por lo tanto, reproducir dicho modelo con el anestésico adecuado en el Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, es de suma importancia para las investigaciones futuras.

Objetivo General

Evaluar el efecto del anestésico idóneo (Pentobarbital sódico o la combinación de Xilacina y Tiletamina-Zolazepam), en la generación de un modelo de la enfermedad de Huntington, inducido con ácido quinolínico en ratones C57BL6/J.

Objetivos específicos

Lograr la estandarización de la dosis efectiva de dos anestésicos: Pentobarbital sódico y la combinación de Xilacina con Tiletamina-Zolazepam, para anestesiarse a los ratones C57BL6/J.

Perfeccionar el procedimiento de la lesión estereotáxica con ácido quinolínico (AQ) o solución salina (SSI) en ratones C57BL6/J de 25-30 g.

Validar la adecuada ejecución del procedimiento de la lesión estereotáxica mediante la cuantificación de los giros ipsilaterales en ratones C57BL6/J lesionados con AQ.

Realizar la comparación del efecto de cada anestésico (Pentobarbital sódico y la combinación de Xilacina con Tiletamina-Zolazepam) en el parámetro de cuantificación de giros ipsilaterales en el modelo inducido con AQ.

Antecedentes:

En nuestro grupo de trabajo se tiene amplia experiencia en la caracterización del modelo excitotóxico inducido con AQ para estudiar la EH. El modelo de inyección con el ácido quinolínico (AQ), consiste en la administración estriatal de los ratones, lo cual tiene un efecto citotóxico que induce cambios conductuales e histológicos (Schwarcz et al., 1983). Este modelo muestra una reducción de los niveles de GABA y sustancia P, sin alterar los niveles de otros neurotransmisores, mimetizando las características bioquímicas expresadas en los pacientes con la EH (Beal et al., 1986).

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (WT, stock no. 000664), reproducidos y mantenidos en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN).

Los ratones fueron mantenidos con agua estéril y alimento Lab Diet® 5001 *ad libitum*. en condiciones de temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas, hospedados en cajas SuperMouse® 750 (4-5 ratones por caja). Los animales serán manipulados de acuerdo con la reglamentación específica para el uso y cuidado de animales, establecida por el comité del INNN y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que refiere a las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Protocolo aprobado No. 105/19.

Anestesia

Se asignaron ratones macho a grupos que recibieron diferentes dosis de Pentobarbital Sódico (n=10, Ps) o combinaciones de Xilacina con Tiletamina-Zolazepam (n=10, XTZ). (Ver tabla 1). Todos los anestésicos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.), con una relación de 10 µl/g (Mayer & Mans, Exotic Animal Formulary, 2018).

Tabla 1. Dosis de Pentobarbital sódico y combinaciones de Xilacina con Tiletamina-Zolazepam. Se asignaron ratones macho C57BL/6J con la intención de tener 2 ratones en

cada grupo, pero debida a la alta mortalidad asociada a cada anestésico, se redujeron grupos. Ambos anestésicos se administraron por vía intraperitoneal.

Pentobarbital sódico (mg/kg)	(n)	Xilacina (5 mg/kg)	(n)
		Tiletamina-Zolazepam (mg/kg)	
50.4	2	20	2
63	2	40	2
75.6	2	60	2
81.9	2	80	2
88.2	2		

Preparación de la solución concentrada de AQ (Ácido. 2,3 piridina dicarboxílico)

Para preparar una solución concentrada del AQ, se pesaron 401.08 mg de AQ (No. CAS 89-00-9, MW 167.12 g/mol) y se disolvió en 7 ml de solución salina isotónica (SSI) en un vaso de precipitados (pp) de 10 ml con agitación constante (utilizar el agitador magnético adecuado). Se preparó 1 ml de solución de NaOH al 1M y 0.1M en tubos de ensayo, posteriormente se adicionaron aproximadamente 500 µL de la solución 1M de NaOH al vaso de pp con el AQ hasta alcanzar un pH de 5.5-6. Luego de la solución 0.1 M se adicionó lentamente de 20 a 40 µl hasta alcanzar un pH de 7.2 a 7.4. Una vez alcanzado dicho pH, se llevó a volumen de 10 ml con SSI, teniendo una concentración de 240 nMol/µl, cuyo uso es para administración en rata; para la administración en ratón, se tomaron 10 µl de la solución para rata y se le adicionaron 70 µl de SSI para llegar a una concentración de 30 nMol/µl. (Schwarcz et al., 1983; Martínez-Gopar et al., 2022)

Lesión intraestriatal con AQ empleando dos diferentes anestésicos: Pentobarbital sódico y una combinación de Xilacina con Tiletamina-Zolazepam

Diez ratones de las cepas C57BL/6J fueron anestesiados con pentobarbital sódico (81.9 mg/kg, i.p.) o con combinación de Xilacina (5 mg/kg) con Tiletamina-Zolazepam (40

mg/kg), y fueron colocados en el aparato estereotáxico. Se utilizó una solución de yodopovidona al 10% para esterilizar la zona de corte, y se realizó un corte sagital (1-1.5 cm) en la línea media entre los ojos para exponer el cráneo del ratón. Se realizó un trepano utilizando las siguientes coordenadas: +0.6 mm anterior y -2.0 mm lateral a bregma. Con una jeringa Hamilton® se inyectó un microlitro de AQ (30 nmol/ μ l) o solución salina isotónica (0.9% NaCl, SSI), bajando -2.7 mm en el trepano para ubicar el estriado derecho, de acuerdo con el atlas de cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2001). La piel se suturó y se supervisaron de 1 a 2 horas hasta su completa recuperación y movilidad, posteriormente se permitió la recuperación durante tres días en cajas limpias y, una vez transcurridas las 72 hrs fueron utilizados para pruebas de giros ipsilaterales.

Preparación de Apomorfina

Se pesó 1.5 mg de apomorfina, colocarlo en un tubo de polipropileno para centrifuga de 15 ml y se disolvió con 10 ml de una solución de ácido ascórbico al 1% p/v para evitar su oxidación (Martínez-Gopar et al., 2022). Mezclar por agitación hasta que la apomorfina quede completamente disuelta.

Determinación del número de giros ipsilaterales para la validación del método

Los animales recibieron una administración de apomorfina (1.5 mg/kg, s.c.), tras las 72 horas de su recuperación, y fueron observados durante 1 hora y se cuantificaron el número de giros ipsilaterales que mostraron en ese periodo. Los resultados fueron expresados como número de giros/60 min (Martínez-Gopar et al., 2022).

Disección del tejido cerebral

Los ratones fueron sacrificados mediante decapitación. Inmediatamente se fracturó el cráneo para exponer el cerebro. La extracción del cerebro se realizó con ayuda de una espátula, y fue lavado en un vaso de precipitado con SSI en hielo y posteriormente se colocó en un vidrio de reloj con papel filtro, todo esto mantenido en hielo. La disección estriatal se llevó a cabo con pinzas tipo relojero para separar los hemisferios y dejar expuesto el cuerpo estriado, por último, se disecó el cuerpo estriado derecho (lado lesionado).

Resultados

Estandarización de la dosis efectiva de anestésicos

En los ratones administrados con pentobarbital sódico, se presentó mortalidad por complicaciones anestésicas tras administrar dosis de carga del 10 hasta el 20 % por gramo de peso en las dosis de 63 y 75.6 mg/kg debido a que había una sedación leve pero no total, la mayoría presentó paro bronco respiratorio en plena cirugía. La dosis de 50.4 mg/kg no tuvo efecto sedante, sin embargo, la dosis de 88.2 mg/kg se catalogó como una dosis letal, solo 1 individuo se recuperó de manera normal, otros con ayuda de una bomba de reanimación lograron salir del parobroncorespiratorio, sin embargo, la mortalidad fue muy alta. Por lo que la dosis efectiva tras las pruebas correspondientes fue de 81.9 mg/kg i.p. y sus cálculos son los siguientes (Tabla 2):

$$\frac{6.3 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1.3 \text{ ml de pentobarbital}}{10 \text{ ml}} \times \frac{0.01 \text{ ml}}{1 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 81.9 \text{ mg/kg}$$

Tabla 2. Observaciones generales de las dosis de pentobarbital sódico evaluadas en ratones C57BL/6J.

Pentobarbital sódico (mg/kg)	% de anestesia lograda	Observaciones
50.4	<50% (0/2)	Presenta nocicepción y movimiento de vibrisas, tras dosis de carga del 20% se logra la anestesia, pero las complicaciones aumentan y hay decesos.
63		
75.6	75-100% (2/2)	Se requiere en algunas ocasiones dosis de carga del 10%.
81.9	100% (2/2)	Dosis efectiva sin que presenten complicaciones
88.2	100% (2/2)	Dosis letal, complicaciones postcirugía.

En el caso de los ratones anestesiados con Xilacina (X) y Tiletamina-Zolazepam (TZ), con la dosis que contenía 20 mg/kg (i.p.) de TZ, se logró una anestesia leve, presentando aun nocicepción y requiriendo una dosis de carga del 20%, la dosis de 40 mg/kg (i.p.) fue la

adecuada, presentando una anestesia total, con una recuperación normal, por lo tanto, la dosis de 60 y 80 mg/kg se descartaron de la prueba (Tabla 3). Los cálculos de la dosis efectiva son:

$$\frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times \frac{0.04 \text{ ml de Zoletil}}{1 \text{ ml}} \times \frac{0.01 \text{ ml}}{1 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 40 \text{ mg/kg}$$

Tabla 3: Observaciones generales de la dosis combinada de Xilacina y tiletamina-zolazepam evaluadas en ratones C57BL/6J.

Xilacina (5 mg/kg)	% de anestesia lograda	Observaciones
Tiletamina-Zolazepam (mg/kg)		
20	75-100% (2/2)	en caso de nocicepción añadir dosis de carga del 10%
40	100% (2/2)	Dosis efectiva sin que presenten complicaciones

Perfeccionamiento del procedimiento de la lesión estereotáxica

Material necesario para la cirugía

Para la cirugía estereotáxica se debe considerar: 1, microespátula; 2, Bisturí de hoja 10; 3, Pinzas de precisión; 4, portaagujas; 5, tijera curva; 6, punzón; 7, tijera recta; 8, Hisopos; 9, Yodopovidona; 10, agua oxigenada; 11, lidocaína al 2%; 12, AQ; 13, Sutura de propileno No.5; 14, jeringas de 1 ml de insulina; 15, jeringa Hamilton de 10 µl. Para información visual observe la figura 2.



Figura 2. Kit de disección para operación estereotáxica. Instrumentos de acero inoxidable Hergom Silvery.

Marco estereotáxico y pruebas previas a la cirugía

El aparato estereotáxico de roedores utiliza un sistema cartesiano 3D, con los ejes x, y y z como ejes mediolateral, anteroposterior y dorsoventral, respectivamente. El instrumento estereotáxico New Standard™ incluye escalas de 100 micras en los 3 ejes, brazo izquierdo manipulador, adaptadores separados para ratón, punto triple en barras para los oídos de ratón, y soporte de la sonda con abrazadera de esquina (Figura 3).



Figura 3. Instrumento estereotáxico Stoelting New Standard™ (No. Catálogo: 51500D).

A continuación, se deberá comprobar el funcionamiento de la bomba y estereotáxico cargando la jeringa Hamilton con la solución a administrar al animal sin meter burbujas de aire entre el volumen, como sugerencia cargar hasta la línea de un número entero. Las condiciones del inyector estereotáxico QSI™ son: Modo infusión, volumen de 1 μl , flujo de .333 $\mu\text{l}/\text{min}$, ID de 0.485. Se comprueba su correcto funcionamiento tomando un tiempo de aproximadamente 3 min cronometrado y verificando que se desplazó un volumen de 1 μl partiendo del número entero inicialmente puesto (Figura 4) se puede proceder con los cuidados preoperatorios y el montaje del animal en el estereotáxico.

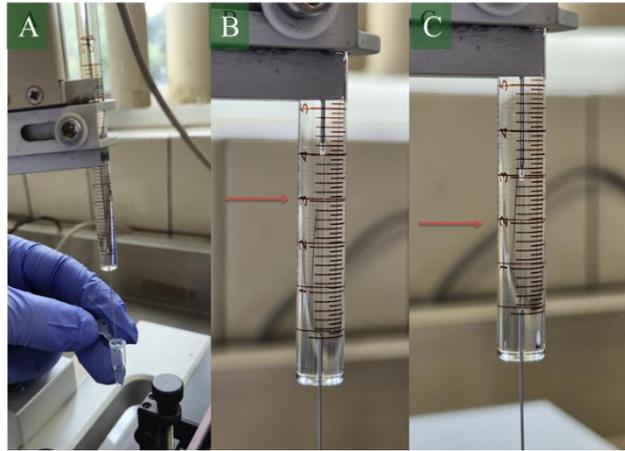


Figura 4. Verificación del correcto funcionamiento del inyector e instrumento estereotáxico: A, carga de solución a administrar; B, carga de volumen hasta un numero entero; C, tras la prueba, como resultado final se debe de desplazar un volumen total de 1 μ l, esto nos asegura que la administración en la cirugía no se verá afectada.

Cuidados preoperatorios y montaje

Antes del comienzo de cualquier procedimiento quirúrgico es fundamental constatar que el animal se encuentra en el plano anestésico adecuado. Para esto se debe comprobar la ausencia de movimiento de vibrisas y respuesta nociceptiva flexora al pinchar superficialmente la planta del pie y cola del animal (Figura 5).

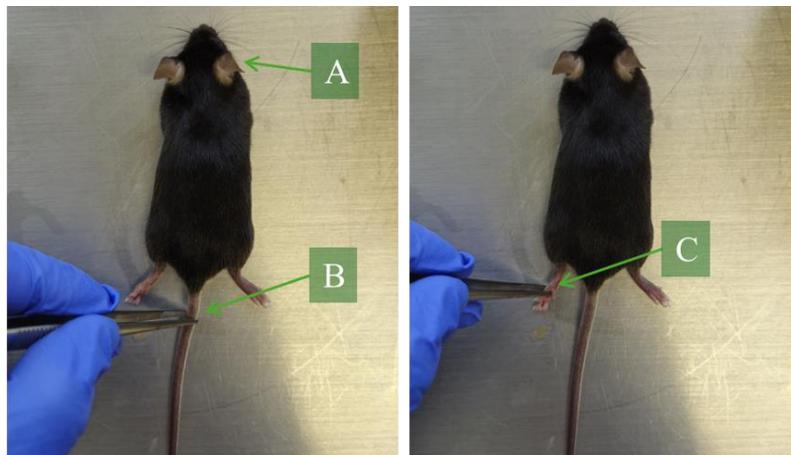


Figura 5. Comprobar estado de anestesia: A, Ausencia de movimiento de vibrisas; B y C, Ausencia de respuesta nociceptiva flexora.

Luego de la inducción de la anestesia se procede a la fijación de la cabeza del animal. Primero se colocarán los incisivos superiores dentro del orificio de la proyección frontal y después se procede a la colocación de las barras laterales en el canal auditivo del animal (Figura 6). Es fundamental corroborar, en ese momento, que la cabeza del animal se encuentre centrada con respecto a los planos sagital y coronal. Asimismo, el extremo de la nariz del animal debe quedar centrado con relación a la proyección frontal del marco estereotáxico (Figura 7).



Figura 6. Fijación de la cabeza del animal: A, ubicación del canal auditivo; B, colocación de las barras laterales del marco estereotáxico; C, ratón con incisivos superiores sujetos en la proyección frontal.

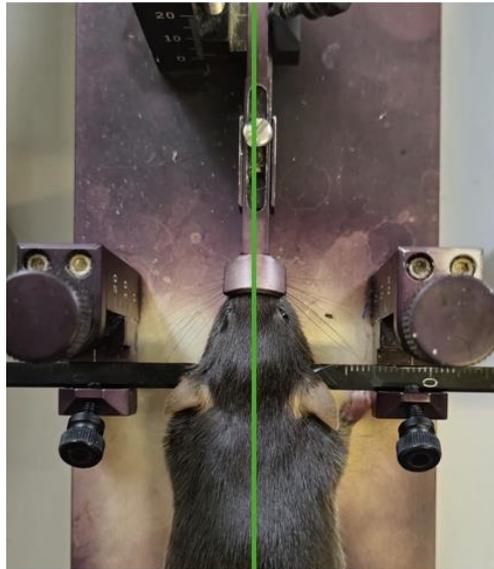


Figura 7. Una vez que el animal ha sido sujetado con las barras laterales del marco estereotáxico se debe comprobar la alineación del eje sagital con respecto a la prolongación anterior del dispositivo de estereotaxia.

Una vez fijado correctamente la cabeza del animal, proceder a exponer el cuero cabelludo pasando un isopo con agua oxigenada, después agregar una gota de lidocaína sobre la piel expuesta y esperar 5 min, para finalizar limpiar el área de incisión con un isopo de yodopovidona. (Figura 8)

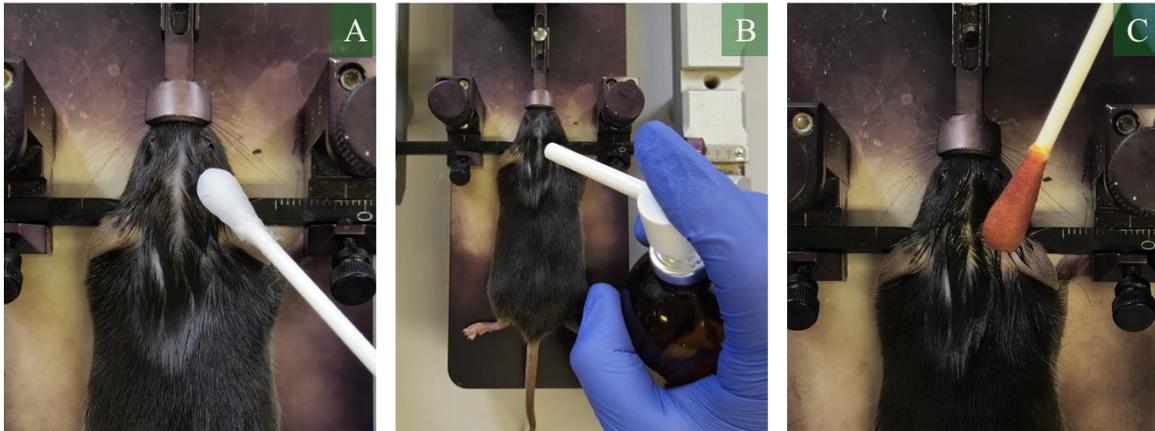


Figura 8. Pasos preoperatorios: A, exponer piel con agua oxigenada; B, agregar lidocaína; C, limpieza con yodopovidona.

Realización de la cirugía

Una vez esterilizada la zona de corte, proceder a realizar un corte sagital (1 – 1.5 cm) en la línea media entre los ojos para exponer el cráneo del ratón. Para establecer el origen de los ejes anteroposterior y mediolateral, son necesarios puntos de referencia visibles en los huesos del cráneo de los roedores. Hay tres suturas en la vista superior del cráneo: la coronal, la sagital y la lambdaoidea. La sutura coronal parece una curva parabólica entre los huesos frontal y parietal. La sutura sagital divide el cráneo en dos lados por la línea medial. La sutura lambdaoidea parece la letra griega Lambda en la parte posterior del cráneo entre ambos huesos parietales y el hueso occipital (figura 9).

En general, el punto entre ambos huesos parietales y el hueso occipital se llama Lambda, mientras que el punto de cruce de las suturas coronal y sagital se llama Bregma, el cual será el punto de origen utilizado en la presente técnica (Cecyn & Abrahao, 2023).

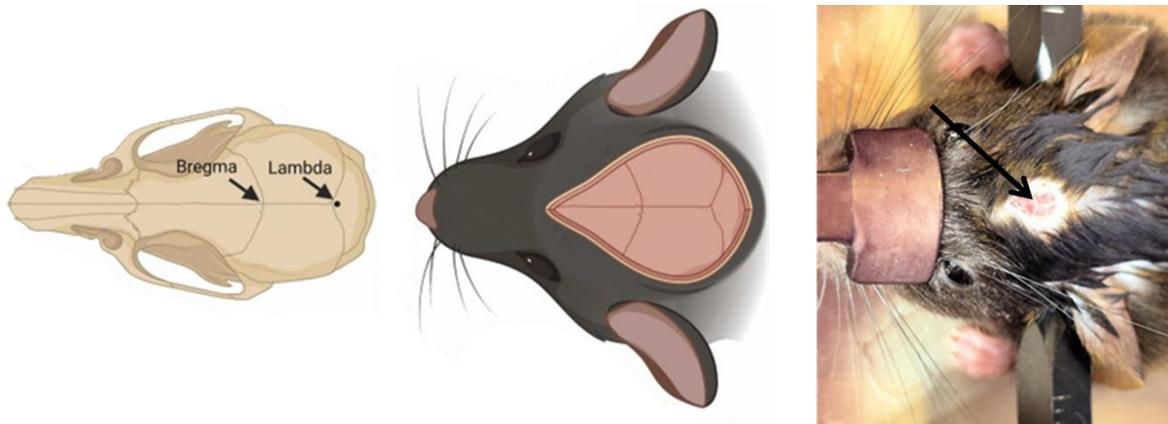


Figura 9. Vista dorsal del diagrama del cráneo de roedor con suturas y puntos de medición detallados de la Bregma y la Lambda basados en Paxinos y Franklin (2019). Así mismo se da puntos de referencia del cráneo en la vista quirúrgica. Es importante tener en cuenta que, durante la cirugía, el investigador verá parcialmente el cráneo según el tamaño de la incisión. Fuente: Cecyn & Abrahao, 2023 y fotografía propia.

A continuación, se debe de posicionar la punta roma de la jeringa Hamilton® en Bregma y se procederá a tomar las coordenadas correspondientes al punto. Luego se realizará el cambio utilizando las siguientes coordenadas: +0.6 mm anterior y -2.0 mm lateral a bregma. Y nuevamente se tomará la coordenada corregida. Posteriormente se procede a posicionar la punta de la jeringa Hamilton en el cráneo del ratón, y se marcará con un lápiz el sitio donde se realizará la trepanación.

Una vez identificado el sitio, proceder con el taladro a hacer el trepano tomando en cuenta en no hacer un trepano demasiado grande y no ejercer demasiada presión al cráneo debido a que podemos, al perforar, lastimar la corteza y causar la generación de un coágulo durante la administración (Figura 10). Es normal que salga sangre del trépano, por lo que se debe limpiar la zona con un isopo con agua salina para absorber la sangre y que quede completamente limpio, visualizándose el tejido.

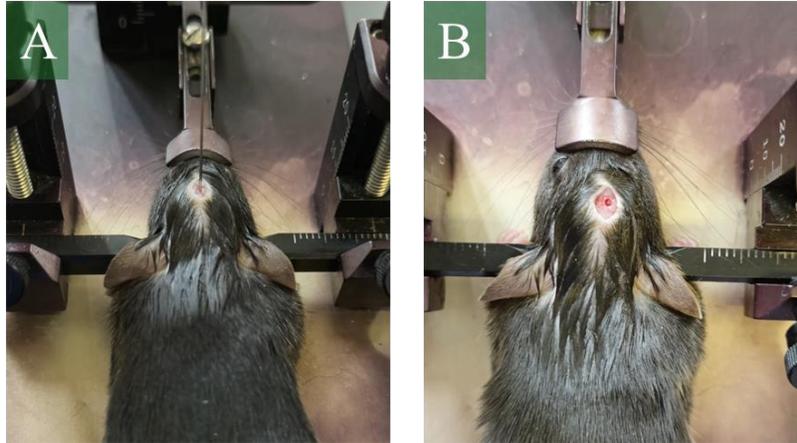


Figura 10. Descripción visual del procedimiento de trepanación: A, localización de bregma; B, trépano con las coordenadas corregidas. Fuente: Fotografía propia.

Una vez finalizado el trépano, se procederá a descongelar una nueva alícuota de AQ 30 nMol/ μ l, y previamente antes de cargar en la jeringa Hamilton® se debe de mezclar por agitación antes de usar con el fin de homogenizar la solución (pasos similares como la figura 4) o en su caso se cargará con SSI. Es importante no utilizar la misma alícuota de AQ para varias administraciones, no puede pasar demasiado tiempo descongelada, se descongela al momento del uso.

Para ubicar el estriado derecho, se debe de bajar -2.7 mm en el trepano, para ello se debe de tomar la coordenada dorsoventral partiendo de que la punta roma de la jeringa Hamilton® toque el tejido. Para evitar que la jeringa se tape por la coagulación de la sangre, eyectar una pequeña gota antes de tomar la medida, una vez teniendo la coordenada, subir la jeringa, realizar el cambio de la coordenada, nuevamente antes de administrar, eyectar mas volumen para verificar su correcto funcionamiento, y finalmente bajar hasta la coordenada establecida. Es importante tener en cuenta que no debe de haber sangre, de ser el caso, retirar nuevamente con un isopo, por otro lado, la perforación del tejido por la aguja debe de ser lenta y continua. Una vez fijada la jeringa en el cerebro del animal, esperar a que el tejido se adapte a esta, esperando aproximadamente 2 min, durante ese tiempo colocar un pedazo de acetato en el empaque del eje Dorsoventral está gastado ya que está gastado y la vibración de la administración provoca que se desplace la coordenada. A continuación, comenzar a infundir el AQ y verificar que el volumen esté bajando conforme avanza la administración en el inyector. Una vez concluida la administración, esperar 10 minutos para la correcta

difusión del AQ. Al término de ese tiempo, proceder a suturar, dependiendo el tamaño de la incisión, será el número de puntos que se realizarán, aproximadamente son 2, y con ayuda de un isopo con yodopovidona se limpiará el área suturada (figura 11).



Figura 11. Pasos finales de la cirugía estereotáxica; A. paso previo a la toma de la coordenada dorsoventral, eyección de gota; B. ubicación exacta del acetato en el empaque del eje dorsoventral; C. Administración de AQ; D. limpieza de área suturada. Fuente: elaboración propia.

Recuperación posterior a la cirugía estereotáxica

Una vez concluida la cirugía, los ratones serán supervisados hasta su completa recuperación y movilidad (aproximadamente tardan entre 1 a 2 horas), hay algunos casos de animales que presentan parobroncorespiratorio y es necesario reanimarlos hasta que salgan del paro. Posteriormente los ratones serán devueltos a sus respectivas cajas y se les dará una

recuperación mayor durante tres días y, una vez transcurridas las 72 h serán utilizados para pruebas de giros ipsilaterales.

Validación del procedimiento de la lesión estereotáxica

Se evaluaron los giros ipsilaterales de ratones administrados con pentobarbital sódico, lesionados con AQ (n=5) y con SSI (n=5), estos fueron observados durante 1 hora tras la administración de apomorfina (1.5 mg/kg, s.c.). En donde se presenta una diferencia significativa ($P < 0.0001$) en relación con el tratamiento de cada ratón. En el caso de los ratones anestesiados con la combinación de Xilacina, Tiletamina-Zolazepam, los lesionados con AQ (n=5) presentaron 10 giros ipsilaterales o menos en la hora de evaluación siendo no significativo (ns) respecto al grupo control, indicando que no hay diferencias entre tratamientos. Por último, se compara la influencia del anestésico en la generación de giros ipsilaterales inducidos por lo efectos del AQ, donde destacan los anestesiados con pentobarbital sódico de los de la combinación de Xilacina con tiletamina-Zolazepam, con una diferencia significativa de (<0.0001).

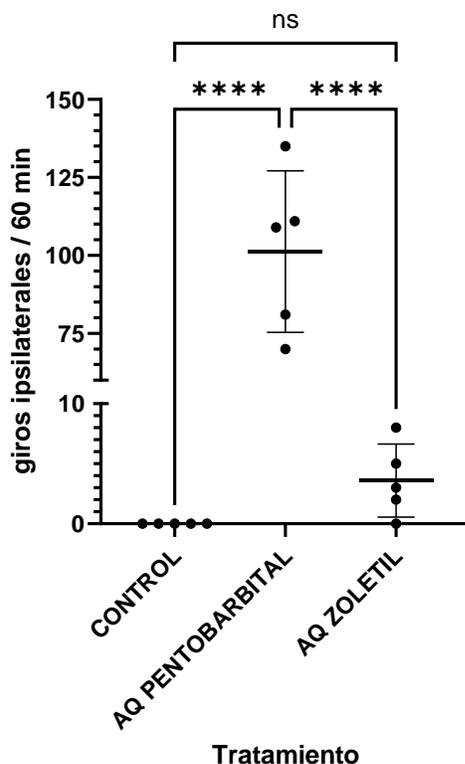


Figura 12. Posible influencia del anestésico en la generación de giros ipsilaterales por el efecto del AQ. R ratones C57BL/6J intraestriatalmente administrados con AQ (30 nMol/ μ l) o 1 μ l de SSI anestesiados con Pentobarbital Sódico o combinación de Xilacina con Tiletamina-Zolazepam. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba Post Hock de Tukey's ****p<0.05; no significativo (ns)

Disección del tejido cerebral

Para asegurar que la lesión fue localizada en el estriado se realizaron cortes histológicos y la disección del estriado derecho (Figura 13). Como se puede observar, la lesión en el estriado fue exacta de acuerdo con Paxinos, 2001.

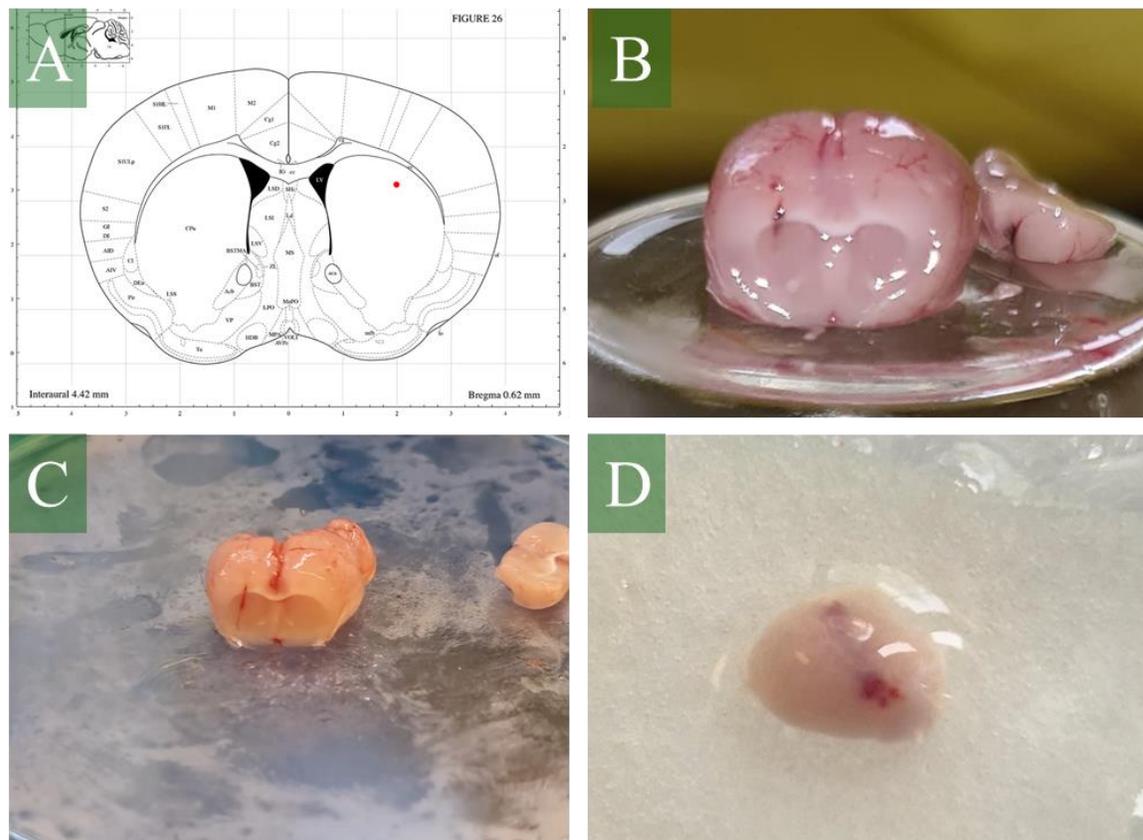


Figura 13. Cortes histológicos y disección del estriado lesionado de ratones C57BL/6J: A, referencia del atlas de Paxinos, 2001; B y C, cortes histológicos con lesión localizada de acuerdo con el atlas del ratón; D, disección del estriado lesionado.

Discusión

El ratón sigue siendo el animal más difícil para el logro de una verdadera anestesia quirúrgica, de acuerdo con Mayer & Mans (2018), para anestesia en ratones i.p. con pentobarbital sódico, ésta dosis está entre 50–90 mg/kg, con una duración menor a 45 min. La dosis efectiva para un efecto anestésico de 81.9 mg/kg i.p. se considera significativamente alta, normalmente se enfatiza en la importancia de utilizar la dosis mínima eficaz para minimizar riesgos debido a que uso de pentobarbital está asociado con depresión respiratoria, hipotensión y, en dosis excesivas, riesgo de toxicidad, sin embargo se necesita equilibrar la eficacia anestésica con la seguridad y el bienestar de los animales de laboratorio, derivado de esto, la dosis de 75.6 mg/kg, pese a que lograba un efecto de anestésica, no se tomó en cuenta ya que requería eventualmente para ciertos individuos una dosis de carga, comprometiendo al ratón y haciéndolo susceptible a tener paros broncorespiratorios antes, durante o después de la cirugía.

Ante las adversidades presentadas durante el procedimiento de la lesión estereotáxica con el pentobarbital, se optó por un anestésico menos invasivo, el Zoletil, el cual es una combinación de Xilacina con Tiletamina y Zolazepam, agonista de los receptores alfa-2 adrenérgicos, antagonista de los receptores NMDA y agonista de los receptores GABA-A, respectivamente. Sin embargo, desde un punto de vista farmacológico, al ser el AQ, un agonista de los receptores NMDA, es posible que el uso del Zoletil, por la Tiletamina, presente propiedades neuroprotectoras ya que este compuesto tiene un amplio volumen de distribución, lo que significa que se distribuye rápidamente en los tejidos del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central, por lo que al lesionar con AQ en una zona tan específica pueda haber una competencia de estos compuestos por el receptor NMDA. Queda en perspectiva evaluar su posible efecto neuroprotector debido al resultado obtenido en la cuantificación de los giros ipsilaterales de ratones anestesiados con Zoletil, y lesionados con AQ, en donde hubo pocos giros ipsilaterales (Figura 12) (Hubbell, et al., 1989; Wilson et al., 1993; Lovelace et al., 2017).

Con respecto a la validación del perfeccionamiento del modelo Martínez-Gopar et al. (2022) reporta que los ratones C57BL/6J lesionados con AQ, presentaron 58 ± 1.47 giros ipsilaterales/60 min. En la presente validación se obtuvo un total de 101.2 ± 11.58 giros

ipsilaterales/60 min, por lo que se asegura que el modelo excitotóxico por lesión estereotáxica con AQ, pudo ser reproducible en el Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología del INNN. Queda como perspectiva aumentar la n de individuos para tener la certeza en el resultado y que sea reproducible.

Conclusión

El uso de anestésicos en ratones C57BL/6J presenta desafíos significativos, especialmente al intentar lograr una anestesia quirúrgica efectiva y segura. La administración de pentobarbital sódico, aunque efectiva en dosis de 50-90 mg/kg, conlleva riesgos de efectos adversos como depresión respiratoria y toxicidad, lo que resalta la importancia de utilizar la dosis mínima eficaz. En este contexto, la elección de Zoletil, se presenta como una alternativa menos invasiva sin embargo puede tener propiedades neuroprotectoras, por lo que es necesaria plantearse si es lo mas adecuado para la reproducibilidad del modelo neuroquímico de la EH.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de giros ipsilaterales sugieren que el modelo excitotóxico es reproducible, aumentando la confiabilidad del estudio. Sin embargo, se subraya la necesidad de incrementar el tamaño de la muestra para reducir la incertidumbre y fortalecer las conclusiones.

Bibliografía

Auerbach, W., Hurlbert, M. S., Hilditch-Maguire, P., Wadghiri, Y. Z., Wheeler, V. C., Cohen, S. I., ... & Turnbull, D. H. (2001). The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Human molecular genetics*, *10*(22), 2515-2523.

Bonilla, E. (1987). Neurotransmisores en la enfermedad de Huntigton: revisión. *Invest. clín*, 99-109.

Bossy-Wetzel, E., Pettrilli, A., & Knott, A. B. (2008). Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences*, *31*(12), 609-616.

Browne SE, Howling AC, MacGarvey U, Balk Mi, Bergvr SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF, 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41: 646-653.

Cecyn, M. N., & Abrahao, K. P. (2023). Where do you measure the Bregma for rodent stereotaxic surgery?. *IBRO Neuroscience Reports*.

Cepeda, C., Ariano, M. A., Calvert, C. R., Flores-Hernández, J., Chandler, S. H., Leavitt, B. R. & Levine, M. S. (2001). NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *Journal of neuroscience research*, 66(4), 525-539.

Coyle, J. T., & Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263(5574), 244-246.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 51(1), 7-62.

Ehrnhoefer, D. E., Butland, S. L., Pouladi, M. A., & Hayden, M. R. (2009). Mouse models of Huntington disease: variations on a theme. *Disease models & mechanisms*, 2(3-4), 123-129.

Ferrante, R. J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(6), 506-520.

Fuentes, N. P., & Pedre, L. L. (2019). Neuroinflamación y Enfermedad de Parkinson. *Panorama Cuba y Salud*, 14(3), 44-49.

Garzón Vázquez, J. A., & GARZON VAZQUEZ, J. A. (2016). Estudio de la cinética de la corriente de GABA en neuronas del núcleo estriado en el ratón C57BL/6 tratado con el ácido 3-nitropropiónico como modelo de la enfermedad de Huntington.

Goodman & Gilman. (2015). Hipnóticos y sedantes. Hilal-Dandan R, & Brunton L.L.(Eds.), *Manual de farmacología y terapéutica*, 2e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.uam.elogim.com/content.aspx?bookid=1468§ionid=93492199>

Gourfinkel-An, I., Cancel, G., Trottier, Y., Devys, D., Tora, L., Lutz, Y., ... & Hirsch, E. C. (1997). Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain. *Annals of neurology*, 42(5), 712-719.

Hubbell, J. A., Bednarski, R. M., & Muir, W. W. (1989). Xylazine and tiletamine-zolazepam anesthesia in horses. *American journal of veterinary research*, 50(5), 737–742.

Kaye, J., Reisine, T., & Finkbeiner, S. (2021). Huntington's disease mouse models: Unraveling the pathology caused by CAG repeat expansion. *Faculty reviews*, 10.

Li, S.H. and Li, X.J. (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* 20, 146–154.

Lovelace, M. D., Varney, B., Sundaram, G., Lennon, M. J., Lim, C. K., Jacobs, K., ... & Brew, B. J. (2017). Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology*, 112, 373-388.

Martínez Gopar, P. E. (2023). Papel del receptor Toll-like 4 en los procesos de neurodegeneración e inflamación asociados a la enfermedad de Huntington.

Mayer, J., & Mans, C. (2018). Rodents. In *Exotic animal formulary* (pp. 459-493). WB Saunders.

Menalled, L. B., & Chesselet, M. F. (2002). Mouse models of Huntington's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 23(1), 32-39.

Möller, T. (2010). Neuroinflammation in Huntington's disease. *Journal of neural transmission*, 117, 1001-1008.

Nestler EJ, Hyman SE, Holtzman DM, Malenka RC, (2015) eds. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, 3rd ed. McGraw Hill, New York.

Pérez-Rodríguez, M. J., Ibarra-Sánchez, A., Román-Figueroa, A., Pérez-Severiano, F., & González-Espinosa, C. (2020). Mutant Huntingtin affects toll-like receptor 4 intracellular trafficking and cytokine production in mast cells. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01758-9>.

Raymond, L. A. (2003). Excitotoxicity in Huntington disease. *Clinical Neuroscience Research*, 3(3), 121-128.

Rothman, S. M., & Olney, J. W. (1995). Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends in neurosciences*, 18(2), 57-58.

Saavedra Lanuza, G. (2023). *Caracterización del perfil transcripcional de citocinas expresadas en células cebadas estimuladas con la proteína S100B, un DAMP asociado a la neuroinflamación que se presenta en la enfermedad de Huntington* (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Farmacobiología).

Schwarcz, R., Whetsell Jr, W. O., & Mangano, R. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 219(4582), 316-318.

Serrano Sánchez, T., Blanco Lezcano, L., García Minet, R., Alberti Amador, E., Díaz Armesto, I., Pavón Fuente, N., ... & Francis Turner, L. (2011). Enfermedad de Huntington: modelos experimentales y perspectivas terapéuticas. *Acta biológica colombiana*, 16(1), 21-42.

Stone, T. W. (2001). Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Progress in neurobiology*, 64(2), 185-218.

Stricker-Shaver, J., Novati, A., Yu-Taeger, L., & Nguyen, H. P. (2018). Genetic rodent models of Huntington disease. *Polyglutamine Disorders*, 29-57.

Sugars, K.L. and Rubinsztein, D.C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet.* 19, 233–238.

Vernau, W., Vernau, K. A., & Bailey, C. S. (2008). Cerebrospinal fluid. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 769.

Vonsattel, J. P. G. (2008). Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica*, 115, 55-69.

Wilson, R. P., Zagon, I. S., Larach, D. R., & Lang, C. M. (1993). Cardiovascular and respiratory effects of tiletamine-zolazepam. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 44(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90274-w](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90274-w)

Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Brundin, P., ... & Raymond, L. A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, 33(6), 849-860.