

## Video-tracking-box: Una nueva herramienta para evaluar la actividad motora y la orientación en ratas sometidas a un daño cerebral

Video-Tracking-Box: A new tool for evaluation of motor activity and orientation in brain-injured rats

Otero L, Zurita M, Bonilla C, Aguayo C, Rodríguez A, Vaquero J

Unidad de Investigación en Neurociencias y Cátedra FUNDACIÓN MAPFRE-Universidad Autónoma de Madrid para Investigación en Daño Cerebral. Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid.

---

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

### Resumen

**Objetivo:** Describir una nueva herramienta de valoración funcional (VÍdeo-tracking-box, o VTB) basada en el test de Smart, para analizar en ratas los déficits consecuentes a un daño cerebral adquirido, y particularmente la actividad motora y la orientación de los animales.

**Material y métodos:** Se utilizó un modelo de lesión cerebral provocado por la administración de 0,5 UI del enzima colagenasa tipo IV, produciendo una hemorragia cerebral en el núcleo caudado. Se realizó un seguimiento de las funciones motoras durante 5 meses, mediante el uso del VTB unido al *software* Smart.

**Resultados:** La totalidad de los animales presentó un déficit en la coordinación motora y en la memoria cognitiva. El estudio demostró que el test VTB-Smart es una herramienta sensible a los déficits crónicos en cuanto a orientación y capacidad motora de los animales, al menos hasta 5 meses después de la lesión cerebral.

**Conclusión:** el VTB-Smart test es una opción fiable para realizar valoraciones de la disfunción motora y de la orientación tras un daño cerebral adquirido en roedores.

**Palabras clave:**

Daño cerebral, valoración funcional, test Smart.

### Abstract

**Objective:** To describe a new tool to analyze the deficits subsequent to brain injury using behavioral tests which evaluate cerebral dysfunction. In this study, we describe a new tool, the Video-Tracking-Box (VTB) linked to Smart software.

**Material and method:** we describe a new tool, the Video-Tracking-Box (VTB) linked to Smart software. This new method adequately quantifies parameters related to motor activity and orientation in brain injured rats. This method has been used in our laboratory in order to measure behavioral outcome after brain injury caused by intracerebral hemorrhage (ICH) in adult Wistar rats. In our experimental model, ICH was induced by stereotactic injection of 0.5 U of collagenase type IV in striatum.

**Results:** ICH injured rats decreased its motor coordination and presented deficits in cognitive memory. VTB-Smart test was sensitive to chronic motor and orientation dysfunction, and it was performed between 1-5 months after ICH.

**Conclusion:** The data demonstrate that our VTB, joined to Smart software, offers a reliable measure to assess motor dysfunction and orientation after brain injury.

**Key words:**

Brain injury, Functional assessment, Smart test.

---

**Correspondencia**

J. Vaquero  
jvaquero@telefonica.net

## Introducción

El modelo experimental de lesión cerebral presenta déficit motores y sensitivos basados en la ralentización de la velocidad de sus movimientos. La principal necesidad, a la hora de utilizar un test de valoración de déficit funcionales motores y sensitivos es que dicho test sea un método objetivo, fácil de manejar y que no requiera una gran cantidad de tiempo.

En los últimos años se han realizado diversos estudios con el objetivo de analizar la disfunción motora y sensitiva como consecuencia a una lesión cerebral en ratas. La mayoría de los métodos utilizados en psicología en roedores son test que estudian el comportamiento animal en un campo abierto [1][2]. El estudio del comportamiento en un campo abierto resulta una herramienta común en el análisis de la deambulación y de la sensación de seguridad que presenta un animal [3]. En algunos estudios se utiliza el campo abierto para examinar la capacidad exploratoria de un animal y el patrón de sus movimientos, tanto posturales como verticales y horizontales [4]. En este trabajo utilizamos el estudio de la trayectoria realizada por un animal en un campo abierto como un método constructivo para analizar la disfunción locomotora que ocurre cuando dicho animal es sometido a una lesión cerebral. Los principales test desarrollados para evaluar coordinación motora y equilibrio después de un daño en el sistema nervioso son el test del rotarod [5] o el test cNSS (complex Neurological Severity Scores) [6] o el test BBB (Basso-Beattie-Bresnehan) utilizado generalmente para evaluar ratas adultas después de una lesión medular [7][8]. Sin embargo, estos test requieren cierto tiempo para su realización o tienen gran complejidad. Además, requieren investigadores especializados y una importante labor de entrenamiento preoperatorio. El VTB-test no necesita entrenamiento previo ni requiere gran cantidad de tiempo para su realización. Además, los test descritos previamente son test útiles en estudios en fase aguda. Sin embargo, el objetivo de nuestro diseño ha sido lograr un test que sea lo suficientemente sensible como para discriminar déficits funcionales neurológicos en modelos de lesión cerebral crónica. Aunque el modelo experimental que se describe corresponde a una lesión cerebral hemorrágica, los datos referentes a la valoración de los animales son aplicables a otros modelos de lesión cerebral adquirida, como la provocada por un traumatismo craneoencefálico.

## Material y métodos

Se utilizaron 20 ratas Wistar hembra de entre 200–250 g de peso (laboratorios Harlan) que fueron sometidas a una lesión cerebral ocasionada por una hemorragia intracraneal

inducida. Se llevó a cabo un seguimiento en la valoración de las funciones motoras y sensitivas de los animales antes y después de la lesión.

En el presente estudio el cuidado de los animales cumplió con los principios estipulados del cuidado de animales de laboratorio y la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio emitido por la Sociedad Americana para la investigación médica.

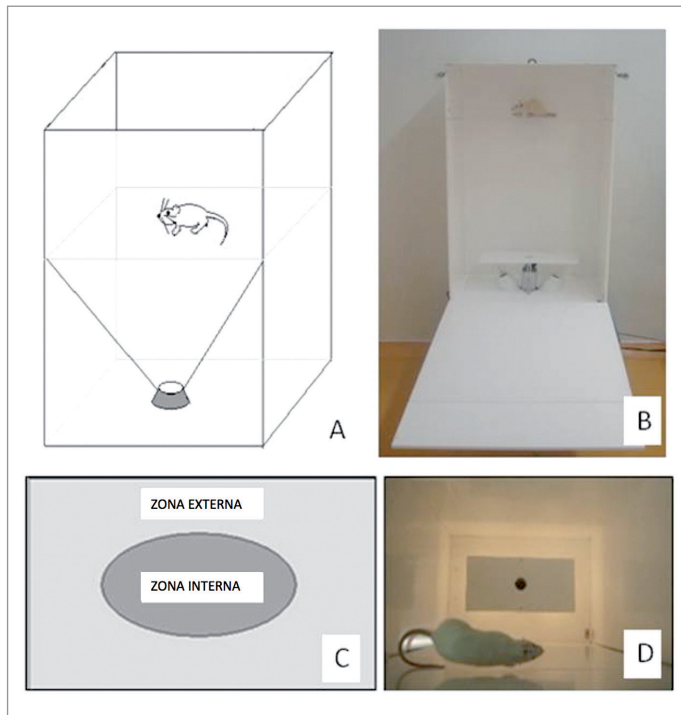
## Modelo experimental de daño cerebral

Los 20 animales fueron sometidos a un modelo de daño cerebral causado por una hemorragia intracraneal. Se anestesiaron en una cámara con sevorane al 8% con un flujo de oxígeno de 5 l/min. Tras la administración intraperitoneal de meloxicam (2 mg/kg) y morfina (2.5mg/kg) se situó a los animales en una guía esterotáxica. Una vez anestesiados, se realizó una incisión en la piel y una craneotomía de 5 mm de diámetro sobre el hueso parietal derecho del cráneo, a la derecha de la sutura bregmática. Tras la exposición de la duramadre, se realizó una inyección intracerebral de 0.5U de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich, Madrid, España) disuelta en 2 µl de suero durante 5 minutos con la ayuda de una jeringuilla Hamilton de 25 µl unida un microinyector (mod 310 Stoelting Co., Wood Dale, IL,USA).

La lesión hemorrágica se localizó en el núcleo caudado y la inyección se realizó tomando de referencia el bregma, con las siguientes coordenadas: 0.04mm posterior, 3.5mm lateral, 6mm ventral. Posteriormente se cerró la incisión de la piel mediante 6 puntos de sutura. Los animales se recuperaron de la lesión en una unidad de cuidados intensivos para pequeños animales que mantiene el ambiente con una temperatura de 25°C, una humedad de 40% y un flujo de oxígeno del 3%, realizándose cuidados postoperatorios acordes con su situación clínica y procedimientos diarios de vigilancia.

## Video-Tracking-Box.

El *software* Smart (PanLab Harvard Apparatus, Holliston, Mass., USA) es un sistema de video capaz de evaluar el comportamiento que presentan los animales de experimentación. Este sistema permite analizar actividad, trayectorias, interacciones sociales y realiza un amplio procesamiento de datos. Video-Tracking-Box (VTB) es una cámara experimental basada en el *software* Smart y desarrollada con la finalidad de optimizar estudios de actividad locomotora y orientación especializada en animales que presentan una lesión cerebral. Consiste en 4 láminas blancas de metacrilato, una tapa y una base blancas (59.5 cm de largo x 38.7 cm de ancho x 94.5cm de alto). Los animales se colocan en una



**Fig. 1.** A y B muestran el diseño del VTB. C: Zonas de estudio de la orientación del animal. D: Aspecto del VTB, mostrando un animal dentro de la caja.

placa de metacrilato transparente situada a 20 cm de la tapa. Los movimientos realizados por la rata son capturados por una cámara a color Exwaver-HAD Sony (Sony Corporation, USA). La visión del animal fue potenciada por una iluminación desde abajo, situando dos bombillas de 60w a 60,5cm del animal. Las bombillas están cubiertas con una capa de cristal que difunde la luz (40 cm de largo x 18 cm de ancho) localizada a 14 cm de la base (Figura 1).

El sistema de Smart establece dos zonas diferentes en la lámina transparente de metacrilato donde se sitúan los animales para su estudio dentro de la caja, la zona interna y el área externa. El sistema analiza la trayectoria seguida por los animales en cada zona. El comportamiento animal de cada zona depende de su capacidad orientativa. Los animales sanos se encuentran la mayor parte del tiempo en la zona externa al refugio de las paredes de la caja como consecuencia a su instinto de mantener su propia seguridad. Sin embargo, los animales lesionados se mantienen la mayoría del tiempo en la zona interna debido a la desorientación que sufren como consecuencia de la lesión cerebral.

#### Valoraciones neurológicas

En este estudio se evaluó a los animales usando diferentes test que permiten valorar parámetros neurológicos inclu-

yendo actividad global, déficits cognitivos en orientación espacial y actividad locomotora. Cuando los animales se situaron en la cámara de metacrilato, el *software* Smart analizó durante 90 segundos la dirección que llevaban los animales sobre la lámina transparente de metacrilato. Con el fin de estudiar todos los parámetros comportamentales relacionados con una lesión cerebral, el *software* Smart analizó los siguientes datos:

#### Actividad locomotora

Este parámetro incluye a) La medida total de todos los movimientos realizados por un animal expresados por centímetro por segundo (actividad global), b) El número total de centímetros recorridos (distancia recorrida) y c) La distancia que los animales son capaces de recorrer por segundo representada en centímetros por segundo (velocidad).

#### Orientación

Con el objetivo de evaluar la disfunción orientativa, Smart analiza el tiempo que los animales permanecen cerca de las paredes del VTB y en la zona interna de la lámina transparente de metacrilato. Los animales sanos se sitúan cerca de las paredes (zona externa) el 98,3% del tiempo de grabación. Sin embargo, los animales después de sufrir una lesión cerebral presentan déficit en su capacidad orientativa y pasan más tiempo en la zona interna. Este cuarto parámetro se cuantifica como el tiempo en segundos que permanece un animal en la zona interna.

#### Test alternativos para valoración del comportamiento animal

Con el objetivo de comparar los resultados de la valoración del daño cerebral con el VTB, con otros métodos ampliamente utilizados en la literatura llevamos a cabo un seguimiento en la valoración de las funciones motoras y sensitivas de los animales mediante dos test de valoración funcional: Test del rotarod (Lab-line Instruments, Inc., Melrose Park, IL) y test de valoración sensitivo-motora.

El rotarod [5] es un sistema objetivo de valoración, ampliamente utilizado y aceptado en la literatura para estudiar el equilibrio y la coordinación de los animales en distintos modelos experimentales. Consiste en un cilindro que acelera de forma constante. El sistema es capaz de cuantificar el tiempo en el que el animal se mantiene sobre el rodillo. Un animal con déficits en el equilibrio y en la coordinación de sus miembros traseros y delanteros tendrá mayor dificultad para mantenerse sobre el rodillo aguantando menos tiempo sobre él.

El test de valoración sensitivo-motora [6] consiste en una escala de 0 a 18 puntos que permite identificar y cuantificar

distintos parámetros de disfunción motora y sensorial de un animal. Un resultado de 0 en esta escala está asociado a una función neurológica normal, sin embargo un resultado de 18 representa el máximo déficit funcional.

### Procesos de evaluación

En este estudio se realizaron 3 sesiones de valoración funcional del animal sano. Estas valoraciones sirvieron para obtener datos concretos sobre el comportamiento del animal en condiciones normales. Estos datos se tomaron como referencia a la hora de analizar los déficits funcionales de los animales posteriores a la lesión cerebral. Además, estas valoraciones sirvieron de entrenamiento animal para los test rotarod y valoración sensitivo-motora. Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar de las tres medidas de valoración. Posteriormente a la lesión cerebral se efectuaron 20 sesiones de valoraciones, una vez por semana durante los 5 meses de duración del estudio. Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar de los datos mensuales.

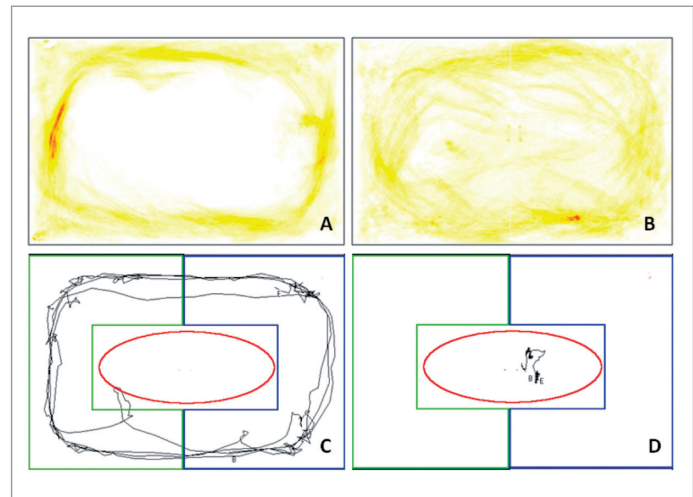
### Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante técnicas estadísticas como el test de Análisis de varianza a través de un soporte informático SPSS v15.0. Previamente se realizó un test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los datos seguían una distribución normal. Se consideró estadísticamente significativo a aquellos datos que presentaron  $p < 0.05$ .

## Resultados

Durante el estudio, la totalidad de los animales presentaron una disfunción neurológica después de la lesión cerebral, que no mejoró significativamente a lo largo del seguimiento.

A objeto de caracterizar el comportamiento normal de un animal en el VTB y tomarlo como referencia, se valoró la conducta animal 3 veces antes de inducirles el daño cerebral. Los animales sanos no mostraron asimetrías comportamentales durante las 3 valoraciones. Estos animales giraron tanto hacia la derecha y como hacia la izquierda indistintamente. Sin embargo, los animales lesionados giraron preferentemente hacia el lado izquierdo debido a la hemiparesia que sufren como consecuencia al daño cerebral en el lado contralateral de la lesión. Los animales sanos recorrieron una distancia total de  $696,39 \pm 21,86$  cm llevando una velocidad media de  $12,39 \pm 0,5$  cm/s en la cámara de metacrilato durante los 90 segundos de grabación. La media de los valores recogidos por el sistema Smart de la actividad global característica del animal sano es  $12,86 \pm$



**Fig. 2.** Registro de la actividad global y de la marcha. Se aprecia la actividad global en animales sanos (A), y en animales con lesión cerebral (B). Se muestra también la trayectoria de la marcha en animales sanos (C), y en animales con lesión cerebral (D).

$0,96$  cm<sup>2</sup>/s. El tiempo que permanecieron en la zona interna de la cámara de metacrilato fue  $1,56 \pm 0,28$  s.

Actividad global: los animales sometidos a una lesión cerebral mostraron un descenso significativo de su actividad global ( $8,24 \pm 1,26$  cm<sup>2</sup>/s) comparados con la actividad global característica de los animales sanos. La actividad global de los animales lesionados se incrementó, aunque no significativamente hasta llegar a un valor de  $9,15 \pm 0,96$  cm<sup>2</sup>/s en el quinto mes (Figura 2).

Distancia recorrida: posterior a la lesión cerebral la distancia recorrida por los animales se vio significativamente afectada disminuyendo hasta una media de  $267,19 \pm 22,62$  cm. Sin embargo, esta distancia recorrida por los animales fue incrementándose hasta llegar a un valor de  $326,19 \pm 39,22$  cm en el quinto mes. No hay diferencias significativas entre los distintos meses posteriores a la lesión.

Velocidad: las ratas lesionadas mostraron una disfunción motora que ralentizó la velocidad de sus movimientos llegando a ser de  $5,52 \pm 0,58$  cm/s. Esta velocidad se incrementó a lo largo del estudio llegando a ser de  $7,82 \pm 0,42$  cm/s en el último mes. Este incremento no fue estadísticamente significativo.

Tiempo de permanencia en la zona interna: la variable recogida para estudiar los déficits en memoria cognitiva y orientación fue el tiempo que el animal se encontraba en la zona interna de la cámara. Los animales lesionados permanecieron un tiempo significativamente superior ( $9,86 \pm 0,37$  s) al tiempo que permanecieron los animales sanos ( $1,56 \pm 0,28$  s).

En el test del rotarod la puntuación media basal obtenida por los animales los tres días anteriores a la lesión fue de  $28,05 \pm 1,87$ . A causa de la disfunción neurológica desencadenada por el daño cerebral, los animales lesionados efectuaron una puntuación significativamente menor que los animales sanos  $18,97 \pm 1,65$  ( $p < 0,05$ ). Los animales lesionados siguieron un comportamiento homogéneo a lo largo de todo el estudio.

En el análisis del test sensitivo-motor los animales lesionados mostraron una clara disfunción sensorial y motora ( $7,74 \pm 0,5$ ) sin mostrar una mejoría significativa a lo largo de los 5 meses de seguimiento.

## I Discusión

El estudio de la gravedad de la lesión cerebral es, hoy por hoy, uno de los retos más importantes para todo profesional involucrado en el diagnóstico y tratamiento del daño cerebral adquirido y requiere modelos experimentales fiables para su reproducción experimental sobre animales. Tanto la elevada incidencia de este tipo de lesiones como las consecuencias funcionales que sufren los pacientes con este tipo de enfermedad, nos ofrecen una idea de la importancia del problema [9].

El modelo de lesión cerebral desarrollado en este estudio causa deficiencias motoras graves que son evidentes en todos los animales inmediatamente después de sufrir el daño cerebral. Para tratar de medir objetivamente los cambios funcionales, se ha desarrollado un sistema de video VTB-smart capaz de discriminar diferencias en la función motora y la orientación de animales lesionados respecto al comportamiento normal de un animal sano.

Se han desarrollado en la literatura métodos de evaluación del comportamiento locomotor y de diferentes aspectos de la memoria espacial. El test principal capaz de medir estos parámetros es el «water maze» test [10][11] en el cual los animales se sitúan en un recipiente con agua y aprenden a ascender a una plataforma. El parámetro característico de este es la velocidad con la cual las ratas aprenden a situarse en la plataforma. Esta herramienta de caracterización de las diferencias neurológicas entre ratas requiere experimentadores especializados y largas cantidades de tiempo para el entrenamiento del animal y para llevar a cabo la valoración funcional diaria [9]. Sin embargo, VTB es un sistema de video unido al *software* Smart que mide objetivamente varios parámetros funcionales afectados por el daño cerebral durante 90sg por cada animal. Además, no resulta necesario el entrenamiento de los animales ni investigadores especializados para realizar la valoración. Asimismo, VTB es un método completamente

objetivo ya que el examinador es un sistema informático, por esta razón, el sistema de doble ciego no resulta necesario en este estudio.

En la literatura se han presentado diversos parámetros utilizados para evaluar la función sensitivo-motora de los animales tras un daño cerebral [12][13]. Autores previos [12] encuentran en el llamado «test de la viga» un efectivo y relevante test, capaz de medir los déficits motores y sensitivos tras un daño moderado en ratón durante dos semanas después de la lesión. Asimismo, el test del rotarod resulta útil para detectar disfunciones de las extremidades. Sin embargo, VTB permite complementar esta información recogida por los test habituales de la literatura contribuyendo, al análisis con datos tanto de la disfunción locomotora como de la actividad global y de la orientación del animal.

Tras los resultados obtenidos en el presente estudio sugerimos que una lesión cerebral induce anomalías en aspectos específicos del comportamiento, tales como desórdenes en la función motora y cognitiva cuando los animales son situados en un campo abierto iluminado. Hoy por hoy se asume que los métodos de estudio en campo abierto evalúan las reacciones emocionales más que la motivación exploratoria. Sin embargo, en contraste con las teorías tradicionales, algunos estudios recientes han sugerido que el comportamiento que lleva a cabo un animal situado en un campo abierto está íntimamente relacionado con la sensación de seguridad [3]. Algunos autores describen la ralentización de los movimientos tras una lesión cerebral como una pérdida de control y coordinación en la actividad motora [14], sin embargo, otra posible explicación para la pérdida de velocidad y actividad global podría ser válida: en primer lugar, la ralentización en los movimientos puede ser debido a una disminución en la resistencia física o a un incremento en la fatiga del animal. En segundo lugar, una lesión en el núcleo caudado del estriado puede cursar con un déficit de atención, consecuencia crítica y necesaria para llevar a cabo el mantenimiento de la coordinación motora [15].

Por otra parte, la lesión cerebral en ratas desencadena pérdida de la orientación espacial. Un animal que presenta este síntoma sufre modificaciones características en su comportamiento susceptibles de ser estudiadas con el método de valoración VTB. El animal que presenta estos déficits permanece menos tiempo en la zona externa de la cámara y como consecuencia aumenta su estancia en el área interior. Es bien sabido que los déficits cognitivos se relacionan con el estriado. Dado que el estriado participa en el circuito córtico-estriado-pálido-tálamo-cortical, la

alteración de este circuito en algún punto afecta a su función [15][16]. Por lo tanto, no es sorprendente que una disfunción estriatal desemboque en fallos en la orientación lo cual no permite a los animales presentar reacciones exploratorias normales y optimizar su seguridad.

Como resumen de estas observaciones, es importante contar con un test que discrimine finamente pequeñas disfunciones neurológicas a lo largo del tiempo. Nuestro estudio demuestra que VTB unido al *software* Smart es un método fiable, preciso y eficiente para medir déficits neurológicos después de una lesión cerebral en animales. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walsh RN, Cummins RA. The open field test: a critical review. *Psychol Bull* 1976; 83: 482-504.
2. Pellis SM, Pellis VC, Chesire RM, Rowland N, Teitelbaum P. Abnormal gait sequence in locomotion after atropine treatment of catecholamine-deficient akinetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:8750-3.
3. Eilam D. Is it safe? Voles in an unfamiliar dark open-field divert from optimal security by abandoning a familiar shelter and not visiting a central start point. *Behav Brain Res* 2010; 206:88-92.
4. Gharbawie OA, Whishaw PA, Whishaw IQ. The topography of three-dimensional exploration: a new quantification of vertical and horizontal exploration, postural support, and exploratory bouts in the cylinder test. *Behav Brain Res* 2004; 151:125-35.
5. Hartman R, Lekic T, Rojas H, Tang J, Zhang JH. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res* 2009; 1280:148-57.
6. Li Y, Chen J, Chopp M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 2001; 10:31-40.
7. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci. Lett* 2006; 398:129-34.
8. Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci. Lett* 2006; 402:51-6.
9. Allred RP, Adkins DL, Woodlee MT, Husbands LC, Maldonado MA, Kane JR, Schallert T, Jones TA. The vermicelli handling test: a simple quantitative measure of dexterous forepaw function in rats. *J Neurosci Methods* 2008; 170:229-44.
10. Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47-60.
11. Devan BD, McDonald RJ, White NM. Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviours in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* 1999; 100:5-14.
12. Hamm RJ, Dixon CE, Gbadebo DM, Singha AK, Jenkins LW, Lyeth BG, Hayes RL. Cognitive deficits following traumatic brain injury produced by controlled cortical impact. *J Neurotrauma* 1992; 9:11-20.
13. Hartman RE, Rojas H, Tang J, Zhang J. Long-term behavioral characterization of a rat model of intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir (suppl)* 2008; 105:125-6.
14. Daly JJ, Fang Y, Perepezko EM, Siemionow V, Yue GH. Prolonged cognitive planning time, elevated cognitive effort, and relationship to coordination and motor control following stroke. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 2006; 14:168-71.
15. Blundell J, Hoang CV, Potts B, Gold SJ, Powell CM. Motor coordination deficits in mice lacking RGS9. *Brain Res* 2008; 1190:78-85.
16. Partiot A, Verin M, Pillon B, Teixeira-Ferreira C, Agid Y, Dubois B. Delayed response tasks in basal ganglia lesions in man: further evidence for a striato-frontal cooperation in behavioural adaptation. *Neuropsychologia* 1996; 34:709-21.

### Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.