



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Medicina



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOTORAS DE LA
CONDUCTA DE NADO INDUCIDAS POR LA ISQUEMIA CEREBRAL
AGUDA EN RATONES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A :
MARTHA DELGADO GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO

REVISOR DE TESIS:
MTRO. ALFONSO SALGADO BENÍTEZ

SINODALES:
DRA. DOLORES RODRÍGUEZ ORTÍZ
MTRA. GABRIELA OROZCO CALDERÓN
DR. J. EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ



MEXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, institución de la cual he formado parte con orgullo durante más de 10 años, espacio en donde gracias a su diversidad cultural e ideológica representa el marco de referencia de una fuente inagotable de experiencias que han enriquecido mi vida y forjado mi desarrollo profesional, mi conciencia social, los valores de respeto y tolerancia, mi filosofía por la vida y en donde se han fundado relaciones entrañables de amistad. Este trabajo materializa los frutos del trabajo y dedicación que me brindó esta casa de estudios así como mi gratitud por constituir uno de los principales pilares de mi vida.

A mis padres por ser quienes me impulsaron y encaminaron en mi educación, por inculcarme los valores de libertad e independencia, honestidad y sencillez, por despertar mi conciencia social, brindarme sus cuidados, apoyo y la seguridad de saber que puedo lograr mis objetivos. Gracias por formar en mí una persona de bien, fuerte y con la claridad de visualizar el camino que quiero seguir. Este trabajo es para ustedes como resultado de que su esfuerzo valió la pena!

A la Dra. Claudia Gómez que en todo momento me ha brindado su dirección, paciencia comprensión y apoyo, quien ha creído en mí y ha hecho de este trabajo una experiencia agradable, fructífera y enriquecedora. ¡Muchísimas gracias por enseñarme que “el que persevera alcanza” Quiero agradecerle también por darme la oportunidad de ampliar mi experiencia dentro de la investigación e inspirarme a continuar mis estudios dentro de este campo.

Al comité del sínodo: Mtro. Alfonso Salgado, Dra. Dolores Rodríguez, Dr. Eduardo Calixto y Mtra. Gabriela Orozco por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus correcciones y opiniones constructivas que le dieron mayor soporte y calidad.

Al Dr. Rodolfo Rodríguez, a la Dra. Rosi Ventura, al Dr. Jacinto Santiago y al Sr. Constantino por permitirme formar parte de su laboratorio y realizar este trabajo dentro de su línea de investigación, por instruirme en los procedimientos de cirugía, por su apoyo durante los experimentos y su disposición para aclarar las dudas que se presentaban. Gracias también por conformar junto con los chicos del Laboratorio de desarrollo de Medicamentos un ambiente de trabajo ameno, cálido y de compañerismo. Gracias chicos por dar seguimiento al proceso de este trabajo y hacer amenas las circunstancias difíciles.

A la Dr. Leti Parra, Don Ale y Jacqueline por compartir las dificultades y logros que la investigación involucra y disfrutar el éxito de encontrar la solución a los problemas que se presentan durante la misma. Gracias por el apoyo brindado, por sus sugerencias y opiniones críticas y por compartir momentos agradables dentro y fuera de la facultad.

Al Dr. Jesús Reynaga por su disposición y paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y brindarme las herramientas para crear las bases sólidas de los resultados de este trabajo y aplicarlo en investigaciones futuras.

A los profesores: Alfonso Salgado, Pablo Valderrama, Livia Sánchez, Irma Zaldivar y Laura Somarriba por transmitirme su conocimiento, iniciar mi formación en la investigación y ayudarme a delimitar el campo en el cual me interesa desempeñarme.

A mis Abuelos quienes a pesar de la época en que vivieron, inculcaron en sus hijos la importancia de la educación y el desarrollo profesional, en especial a mi abuelita Andrea por brindarme su enorme cariño.

A cada uno de los integrantes de mi familia: tíos y primos que siempre han estado pendiente de mí brindándome su cariño y solidaridad, quienes de manera muy especial han contribuido en la formación de mi persona.

A Nancy y Jaime quienes me han visto crecer y he mantenido un vínculo especial, como buenos hermanos mayores me han brindado su apoyo en todo momento. Esto es para ustedes por su cariño y atención, se que siempre podré contar con ustedes.

A mis muy queridos amigos Irene, España, Grissel, Toño, Viridiana, Vela, Marisol, Teresa y Daniela al lado de quienes realicé mis estudios y compartí cantidad de buenos momentos y experiencias propias que deja el ser un estudiante universitario, conformando así una red familiar de la cual recibí apoyo y en la cual sé que puedo confiar. Gracias por continuar manteniendo nuestra amistad.

A Esteban Mena por compartir gran parte de mi camino profesional, por aprender y crecer juntos, por estar en los momentos más difíciles, por brindarme en todo momento su apoyo, cariño y ánimo durante la elaboración de este trabajo, por su amistad y nobleza. Gracias por darle un nuevo toque de luz a mi vida.

A mi hermano Israel Ramírez y al poeta Christian Barragán de quienes gracias a su bagaje cultural y enriquecedoras conversaciones aprendo continuamente de la vida y dejan en mí la reflexión, serenidad y una nueva perspectiva de analizar las cosas. Mi enorme agradecimiento de poder conocerles y compartir una amistad como la nuestra.

A mi tía y a mi primo que en todo momento los llevo en mi pensamiento, quienes me gustaría que estuvieran presentes y compartieran este logro conmigo.

Índice

Resumen

1. Antecedentes

1.1 Enfermedad Vascular Cerebral.....	9
1.1.1 Mortalidad.....	9
1.1.2 Factores de riesgo.....	10
1.2 Isquemia cerebral aguda.....	10
1.2.1 Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	14
1.2.2 Consecuencias Clínicas de la Isquemia cerebral.....	19
1.2.3 Modelos animales de isquemia cerebral.....	24
1.3 Modelo de sección secuencial de las arterias carótidas comunes.....	27
1.3.1 Características de SSACC.....	28
1.4 Alteraciones conductuales inducidas por la isquemia cerebral provocada por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes.....	29
1.5 Conducta de nado.....	31
1.6 Evaluación del daño isquémico en el modelo de SSACC.....	31
1.7 Fármacos neuroprotectores.....	32

2. Razonamiento científico

2.1 Planteamiento del problema. Justificación.....	35
2.2 Hipótesis.....	37
2.3 Objetivo.....	37

3. Material y métodos	
3.1 Animales.....	38
3.2 Procedimiento quirúrgico.....	38
3.3 Mortalidad.....	39
3.4 Modelo de conducta de nado.....	39
3.5 Diseño experimental.....	39
3.6 Prueba farmacológica.....	40
3.7 Análisis histológico.....	41
3.8 Análisis estadístico.....	41
4. Resultados	
4.1 Experimento Preliminar.....	45
4.1.1 Mortalidad.....	45
4.1.2 Conducta de nado.....	47
4.1.3 Patrón conductual.....	57
4.2 Experimento 2.....	68
4.2.1 Mortalidad.....	68
4.2.2 Conducta de Nado.....	70
4.2.3 Patrón conductual.....	84
4.3 Efectos del fármaco sobre la mortalidad.....	92
4.4 Efectos del fármaco sobre la conducta de nado.....	94
4.5 Efectos del fármaco sobre el patrón conductual.....	95
4.6 Análisis histológico.....	98

5. Discusión.....	101
6. Conclusión.....	116
7. Referencias bibliográficas.....	117
8. Anexos.....	132

Resumen

La enfermedad vascular cerebral es la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad física y cognitiva en adultos mayores en México, el síndrome que se presenta con mayor incidencia es la isquemia cerebral. Éste déficit en el flujo sanguíneo en el cerebro, genera una amplia gama de manifestaciones clínicas: neuromusculares, cognitivas, sensoriales y conductuales, que producen secuelas importantes que imposibilitan la realización de actividades cotidianas en los pacientes. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar las alteraciones motoras inducidas por la Sección Secuencial de las Arterias Carótidas Comunes (SSACC) en la conducta de nado (experimento preliminar y la eficacia neuroprotectora del antioxidante dexrazoxano sobre la mortalidad y las alteraciones motoras de los animales (experimento 2). Para ello, se emplearon ratones macho envejecidos (cepa Taconic, de 37-40 semanas de edad), los cuales fueron aleatoriamente distribuidos en tres grupos (control, sham y SSACC). El entrenamiento de la conducta de nado se realizó durante una semana, posteriormente bajo anestesia con éter, los animales fueron sometidos al corte secuencial de la arteria carótida común izquierda. Treinta y dos días después, se repitió el procedimiento con la arteria carótida derecha. Durante el segundo experimento se administró una dosis única de dexrazoxano (32 y 128 mg/kg) por vía intraperitoneal 15 min después de la segunda cirugía. La prueba conductual se realizó antes de la cirugía (basal) y 24, 48, 72 h después de cada cirugía utilizando una piscina rectangular (15x25x80 cm) de acrílico transparente, con una plataforma negra de polietileno (9 cm de diámetro x 9.5 cm de altura) en uno de sus extremos. El nivel del agua (20°C) se mantuvo al nivel de la plataforma. Para el segundo experimento el registro se amplió hasta las 96 h post-cirugía. Se midieron los valores de latencia, distancia, velocidad y porcentaje de flotación así como el ángulo de nado con respecto al nivel del agua, el tipo de nado (recto o zigzag), si el animal tocó las paredes de la piscina, si tocó la plataforma y regresó, si presentó hundimiento, rotación, lateralización o flexión de las extremidades. Cada prueba se videograbó y reprodujo en formato lento para su análisis. Se identificó que la sección unilateral modificó levemente los parámetros evaluados. Después de la segunda cirugía, se encontraron diferencias significativas en los parámetros de latencia, distancia y velocidad del grupo SSACC comparado con su basal y con respecto al grupo sham, siendo las diferencias más importantes después de las 72h postcirugía y sin evidencia de recuperación. No se encontraron diferencias entre el grupo sham y el grupo control. Se cuantificó que los animales del grupo SSACC presentaron una reducción en el patrón de

alteraciones motoras después de administrarse el dexrazoxano así como un mejor desempeño en los parámetros de latencia, distancia y velocidad a partir de las 72 h post cirugía. Los resultados obtenidos revelaron que la SSACC provocó incoordinación motora que puede ser cuantificada con la prueba de nado descrita en este trabajo y que el dexrazoxano es un fármaco que sugiere eficacia neuroprotectora.

1. Antecedentes

1.1 Enfermedad vascular cerebral (EVC)

El cerebro, es un órgano complejo que recibe 750 ml/ minuto de aporte sanguíneo constante y estable permanentemente que es remplazado en un 90% en 5 seg, una alteración en este flujo por breve que sea, es suficiente para causar un impacto significativo en él (Pebet, 2002). Las anormalidades que frecuentemente se generan en este sistema de irrigación sanguínea pertenecen al rubro de enfermedades vasculares cerebrales (EVC) y constituyen el tipo más común de trastornos del sistema nervioso central. Las EVC son procesos patológicos de instalación súbita que son provocados por dos tipos: ya sea por la ruptura de un vaso sanguíneo que produce una hemorragia intracerebral denominado también EVC de tipo hemorrágico (Afifi, 2006). El otro tipo es el *isquémico*, debido a la obstrucción del flujo sanguíneo por un trombo generado por la formación de placas arterioescleróticas en el trayecto vascular que disminuya el diámetro de la arteria, o también por un émbolo formado de pequeños coágulos sanguíneos ya sea en el corazón o en venas varicosas, éste puede ser debido a grasas, gases o por acumulaciones bacterianas (Alcalá J, 2007). De ambos síndromes, el que se presenta con mayor incidencia es el de tipo cerebrovascular isquémico, con aproximadamente el 80% de todos los casos (Van der Worp, 2007). El 20% restante corresponde a un evento hemorrágico, cuya letalidad es mayor. Ambos síndromes generan manifestaciones clínicas importantes que afectan la calidad de vida de los pacientes.

1.1.1 Mortalidad

En la actualidad, el impacto que las EVC tienen en la población es muy alto, pues de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, ocupan el segundo lugar a nivel

mundial como causa de muerte en pacientes mayores a 55 años (Pebet, 2002) y es una de las primeras causas de ingreso hospitalario (Villanueva, 2004).

En México, los datos arrojados por la Encuesta Nacional de Salud entre los años 2001 a 2005, señalan que el 70% de las muertes por EVC ocurre en personas mayores de 60 años, ocupando el tercer lugar como causa de muerte, en este grupo de personas (Secretaría de Salud, 2006). En cuanto a la frecuencia por sexo, se encontró que el 53.1% de las muertes correspondió a mujeres con una edad promedio de 74.6 años en tanto que el 46.9% con una edad promedio de 71.9 años perteneció a los hombres, esto indica que en la población mexicana las mujeres son quienes tienen una mayor mortalidad no obstante presentan un promedio de vida mayor que los hombres. Sin embargo, se considera que estos datos son sólo una pequeña muestra que está lejos de reflejar la verdadera incidencia que éste evento tiene en el país debido a la cantidad de diagnósticos imprecisos que son otorgados, pues simplemente en el 2003 el 75% de los casos no se especificó a que tipo de EVC correspondía (Alcalá, 2007).

1.1.2 Factores de Riesgo

La alta prevalencia de las EVC encaminaron una línea de investigación y análisis epidemiológico con el fin de generar mayor conocimiento y prevención en grupos de riesgo, es así como se logró identificar aquellos hábitos, caracteres y anomalías que se acompañan de un aumento notable en la predisposición para desarrollar esta enfermedad (Pebet, 2002).

Los factores de riesgo identificados pueden dividirse en modificables y no modificables, dentro de los no modificables se encuentran: la edad ya que la incidencia del EVC aumenta con la edad. La mayor incidencia de los casos se reporta en personas mayores de 55 años; los hombres corren mayor riesgo de sufrir un EVC que las mujeres

sin embargo, quienes tienen un promedio de vida más prolongado son las mujeres y por ello hay mayor número de mujeres con EVC que hombres. Otro factor es la historia familiar, personas con antecedentes familiares de EVC tendrán una incidencia mayor. La raza también forma parte de estos factores, por ejemplo los afroamericanos presentan la tasa más alta con EVC aunque todavía no se conocen bien las razones (Alcalá, 2007; Sacco, 2002; Pebet, 2002).

Por otro lado se encuentran los factores modificables, definidos como el conjunto de alteraciones predisponentes que se originan varios años antes de que se presente el EVC. Dentro de los descritos se encuentra principalmente la hipertensión arterial sistémica, en México cerca de 15 millones de personas son hipertensas y el 61% de ellas ignoran que la padece (Gaceta UNAM, 2008). Otras enfermedades que generan un mayor riesgo de sufrir una EVC son la diabetes mellitus tipo II; enfermedades cardíacas como los trastornos del ritmo, las coronariopatías y las valvulopatías; así como la obesidad dado que se asocia con hipertensión, el sedentarismo, el tabaquismo, el alcoholismo y el abuso de otras drogas (Sacco, 2002).

1.2 Isquemia cerebral

Definición y tipos

La isquemia cerebral aguda es la consecuencia de una reducción parcial o total del flujo sanguíneo al encéfalo de menos de 30 ml/100 g/minuto, habitualmente debida a la oclusión de una arteria principal por un trombo o un émbolo. Si este evento se prolonga por más de 5 minutos, disminuye el aporte de sustratos, particularmente de oxígeno y glucosa, lo cual, altera los procesos que mantienen los potenciales eléctricos de la membrana. Esta crisis dispara varios procesos a nivel celular y subcelular que culminan con alteraciones funcionales e inclusive la muerte neuronal (Hazell, 2007).

Los estudios morfofuncionales de la isquemia cerebral aguda han revelado la existencia de un núcleo de isquemia aguda llamado núcleo isquémico o core, el cual está rodeado por un área de irrigación reducida denominado penumbra isquémica (Fig. 1), donde las células pueden permanecer viables por varias horas (Dirnagl, 1999). En el núcleo isquémico, el aporte de glucosa y oxígeno insuficiente produce eliminación de las reservas de energía provocando la muerte de las células durante los primeros minutos posteriores al infarto, mientras que las neuronas que se localizan en la penumbra sobreviven gracias al aporte sanguíneo de los vasos colaterales; sin embargo, si el aporte energético no logra restablecerse se estima que alrededor del 50% de estas neuronas de la penumbra mueren (Saeed et al., 2007), la supervivencia celular y la recuperación funcional son proporcionales al volumen que escapa de la muerte, constituyendo el blanco primario de protección farmacológica (Jordán, 2007; Hossmann, 2008). Una variable crucial para salvar la mayor cantidad de tejido en el área de penumbra la constituye el factor tiempo, pues transcurridas 3 h después del evento isquémico, más del 50% del área de penumbra se reduce, siendo entre las 6 y 8 horas cuando casi toda el área desaparece y sufre daño irreversible (Hossmann, 2006; Fig. 2).

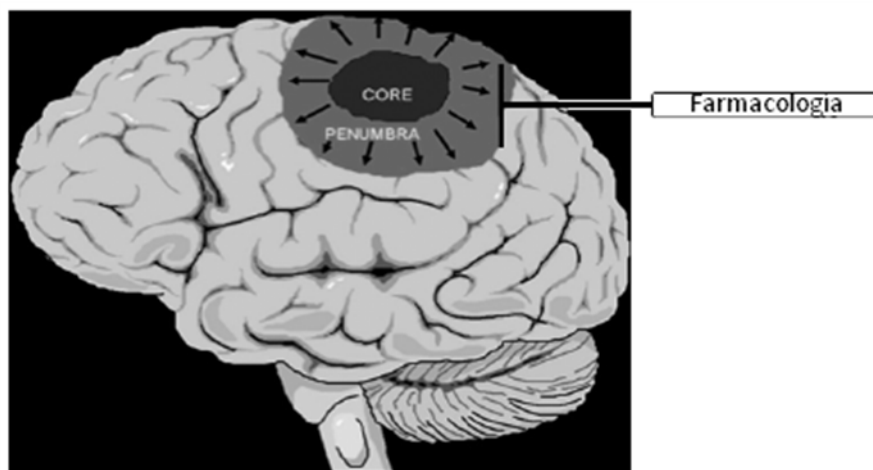


Figura 1. Núcleo isquémico también llamado core y área de penumbra (tomado y modificado de Jordán, 2007). Cuando ocurre una oclusión arterial, se genera un área

denominada núcleo isquémico en donde el daño es irreversible, alrededor de éste permanece un tejido con una ligera perfusión que le permite mantenerse viable durante un tiempo breve. Si el flujo cerebral se restablece entonces este tejido puede salvarse, por ello el rescate del área de penumbra representa el blanco farmacológico principal para evitar consecuencias o secuelas.

La isquemia cerebral puede ser de dos tipos: 1) focal y 2) general o global. En la isquemia focal, permanece cierto nivel de circulación colateral, lo cual podría intervenir en la supervivencia de las neuronas y en la reversibilidad del daño neuronal después de periodos de isquemia. Por tal motivo, la isquemia focal es considerada en algunos casos como tratable. Por otro lado, la isquemia global, se caracteriza por la falta de flujo de sangre colateral, lo cual provoca un daño cerebral irreversible en un periodo corto de tiempo (4-8 minutos; Bradberry, 1993). Existe también una subclasificación de isquemia, denominada isquemia transitoria, llamada así porque la obstrucción dura menos de 24 hrs. Por lo general no deja secuelas importantes pero pueden preceder a accidentes mayores o generar zonas múltiples de pequeños infartos que con el tiempo darán origen a un cuadro de deterioro en la actividad intelectual del paciente (Ardila y Ostrosky, 1991).

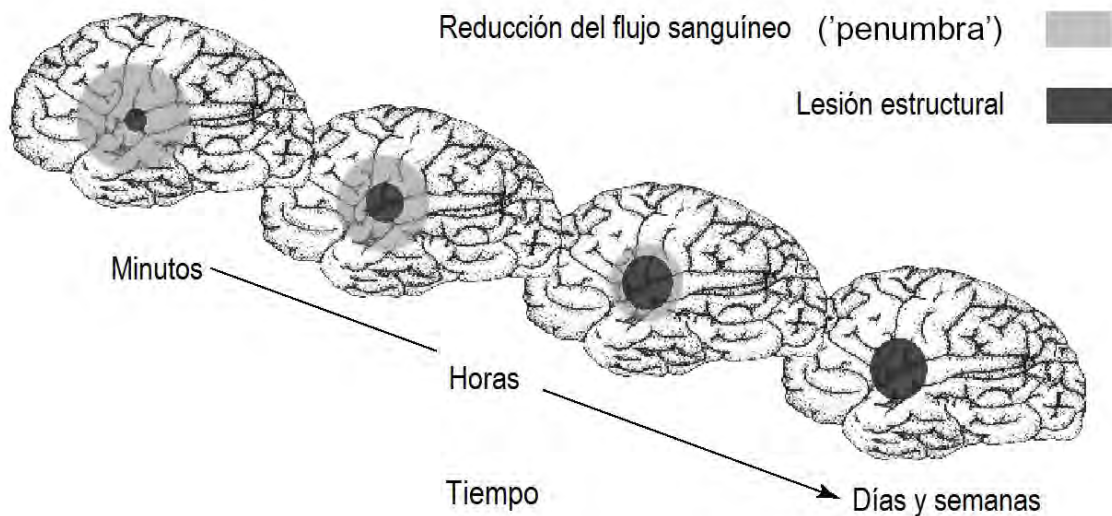


Figura 2. Evolución de la penumbra isquémica en el transcurso de los días (tomado y modificado de Dirnagl, 1999). En esta imagen se representa como con el paso del tiempo el área de penumbra va reduciéndose hasta desaparecer y convertirse en un área de lesión estructural irreversible, provocando déficits estructurales específicos.

1.2.1 Fisiopatología de la Isquemia

Cuando ocurre una detención en el flujo sanguíneo cerebral, se interrumpe el aporte de oxígeno y glucosa, si esta situación no se revierte rápidamente entonces, se activará una cadena compleja de eventos bioquímicos y metabólicos que alteran la fisiología celular y pueden llegar incluso a provocar muerte neuronal (Dirnagl, 2003a; Fig.3). Dentro de los mecanismos de daño celular que se generan en la cascada isquémica, se incluyen la acidosis láctica, la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la producción de radicales libres, la inflamación y la apoptosis (González et al., 2006). Cada uno de estos procesos fisiopatológicos ocurren dentro de un marco diferente de tiempo, algunos se presentan a los pocos minutos de iniciado el evento, otros en horas y unos más en días (Doyle, 2008; Fig. 3). A continuación se abordará brevemente cada uno de los componentes de esta cascada.

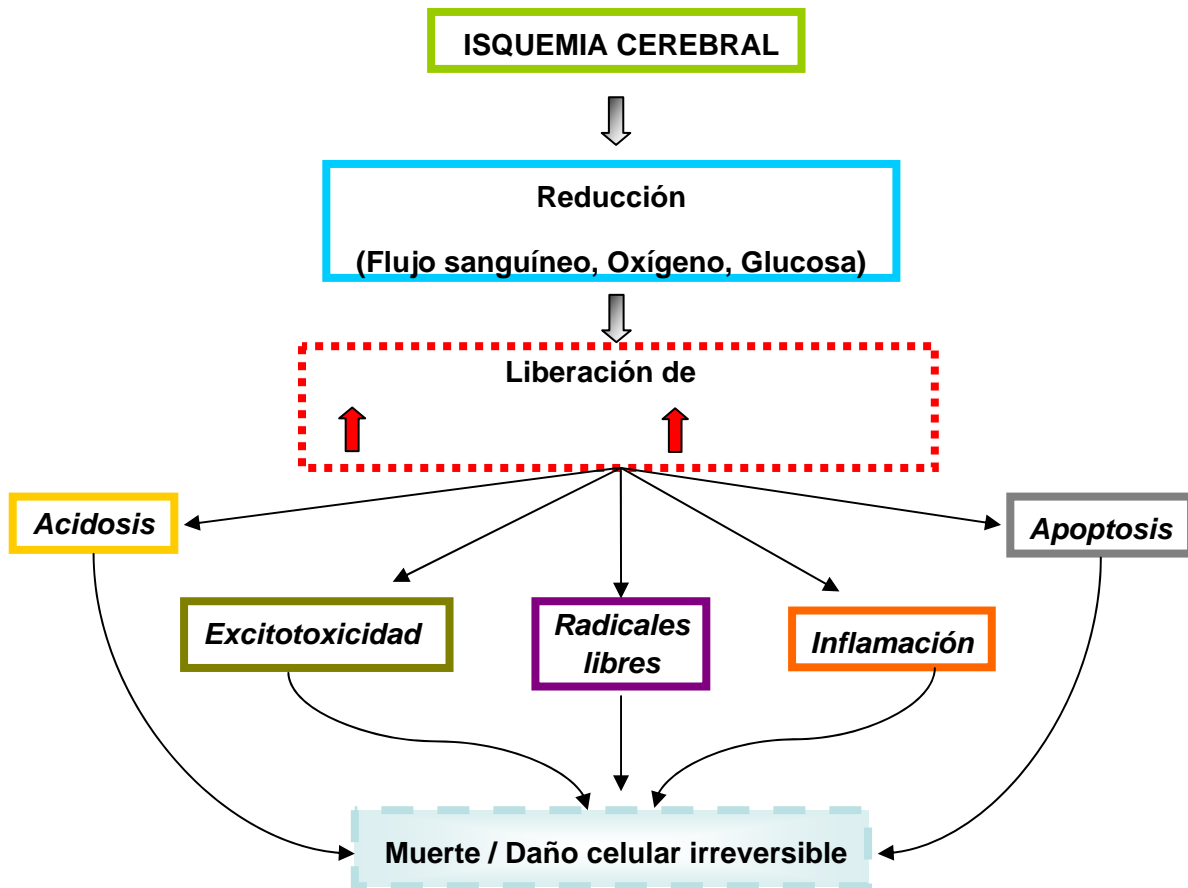


Figura 3. Eventos que desencadena la isquemia cerebral. La detención en la irrigación del flujo cerebral genera que la isquemia cerebral ocurra, causando una reducción de oxígeno y glucosa que rompe la homeostasis celular. Esta situación provoca que se presenten diferentes mecanismos que llevan a la muerte neuronal. Cada uno de estos procesos patofisiológicos ocurre en un marco de tiempo diferente.

Acidosis láctica.

Durante los primeros minutos posteriores al cese de la irrigación sanguínea, el oxígeno y la glucosa que normalmente llegan a las neuronas, se consume rápidamente provocando una alteración en la respiración mitocondrial. Ante esta situación, las neuronas comienzan a transformar la glucosa residual en ácido láctico, el cual va aumentando hasta llegar a un nivel máximo que causa acidosis. Si la acidosis es severa entonces, se agravará la lesión isquémica (Guevara, 2004).

Excitotoxicidad

Cuando se produce la isquemia cerebral, las bombas de Na^+ y K^+ comienzan a fallar debido a la falta de ATP, como consecuencia, sale de la célula una cantidad importante de potasio e ingresa sodio, calcio y agua. Este desequilibrio iónico genera una depolarización de la membrana que permite la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Pebet, 2000) provocando el ingreso de calcio que a su vez induce la liberación excesiva de glutamato y una alteración en el mecanismo de su recaptura. El aumento de la concentración extracelular de glutamato estimula principalmente a los receptores NMDA, quienes abren sus canales y elevan los niveles de calcio en el interior de la membrana (Castillo, 2003; Easton, 2006). El aumento de calcio finalmente, actúa en el impulso de procesos que conducen al daño neuronal irreversible deteriorando las membranas, neurotransmisores y mitocondrias, inhibiendo la síntesis de proteínas, activando la síntesis de óxido nítrico (ON) e incrementando la generación de radicales libres (Block, 1999). La evidencia indica que la excitotoxicidad mediada por glutamato representa la mayor consecuencia de daño en el evento isquémico (Hazell, 2007).

Inflamación

En el transcurso de horas a días posteriores a la isquemia ocurre una fase de inflamación caracterizada por la activación de las células gliales (microglia y astrocitos) que contribuye al daño neuronal (Block, 1999). Esta respuesta inflamatoria, es mediada y modulada por la acción de las citocinas (Culmsee, 2006) particularmente la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-6 (IL-6) (Wang, 2005). Se considera que la sobre expresión de las citocinas durante la isquemia se debe al aumento de calcio intracelular (Guevara, 2004).

Radicales libres

Los radicales libres son especies reactivas que se caracterizan por tener un átomo con electrones no apareados, que tienen la capacidad de reaccionar con otras moléculas fácilmente (Pebet, 2002). La producción de estos radicales se genera mediante un proceso de oxidación que ocurre cuando un electrón no apareado atrae al electrón de otra molécula, dejando a esta última con un electrón no apareado que se convierte en otro radical (Santiago, 2005a). En condiciones normales, los radicales libres se encuentran presentes en el organismo manteniéndose dentro de un rango adecuado por medio de mecanismos antioxidantes, sin embargo, durante el evento isquémico y en el período de reperfusión, estos radicales se forman en exceso debido, entre otras cosas, al daño que sufre la mitocondria por la acumulación de calcio que como anteriormente se mencionó, incrementa las concentraciones de óxido nítrico (NO) y la producción de radicales de oxígeno. Esta actividad en conjunto provoca la pérdida de la integridad del citoesqueleto, alteración en la función mitocondrial (Guevara, 2004), inhibición de transportadores de glutamato, degradación de la membrana celular que conduce a la necrosis y daño en el

ADN celular que conduce a la apoptosis, dado que los radicales activan directamente a las caspasas, enzimas que inducen la apoptosis neuronal (Pebet, 2002).

Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es una forma activa de muerte celular que es esencial para la homeostasis tisular, el componente central de este proceso son las caspasas (Culmsee, 2005), que están involucradas en el mecanismo de inicio y ejecución de apoptosis. La función de las caspasas consiste básicamente en detener el ciclo celular e inactivar la reparación del ADN, inactivar los mecanismos de inhibición de la apoptosis y dismantelar el citoesqueleto celular (Wang, 2005). La evidencia experimental indica que esta muerte programada también se presenta durante un evento isquémico. Debido a la reducción de ATP, al desequilibrio iónico y a la liberación masiva de glutamato durante la isquemia (Krupinski, 2000), la mitocondria se altera, originando con ello la liberación de varias proteínas pro apoptóticas, como el citocromo C que se encarga a su vez de activar caspasas (Doyle, 2008). Ante la evidencia de esta vía de señalización, se considera que la mitocondria es una de las estructuras clave que participa en la inducción de esta tipo de muerte celular.

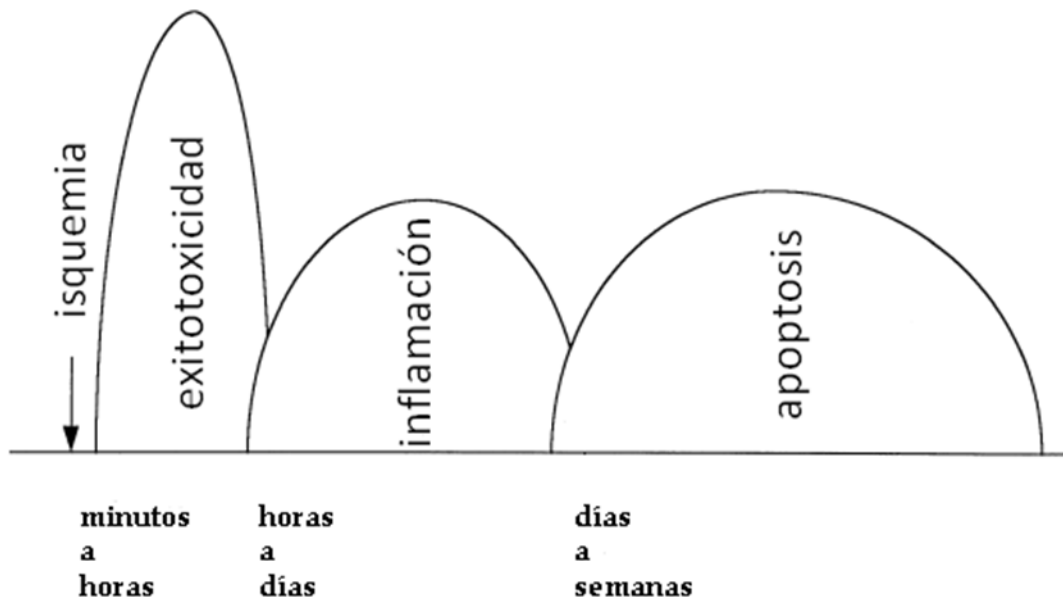


Figura 4. Evolución temporal de la cascada patofisiológica causada por la isquemia cerebral (tomada de Block, 1999). Cuanto más prolongado sea la reducción del flujo sanguíneo, el número de células que se lesionan será mayor y el déficit más grave, debido a la sucesión de procesos patofisiológicos que se presentan durante el tiempo.

1.2.2 Consecuencias clínicas de la isquemia cerebral

Antes de abordar las alteraciones causadas por la isquemia cerebral, resulta esencial conocer la anatomía vascular cerebral normal, descrita brevemente a continuación.

La irrigación sanguínea cerebral depende de dos importantes sistemas de circulación: el de circulación anterior o carotideo y el de circulación posterior o vertebrobasilar (Fig 5). Ambos sistemas, forman en la cara inferior del cerebro el polígono de Willis que funciona como sistema de circulación colateral en caso de que se presente una falta de irrigación (Afifi, 2006). También penetran tanto en los hemisferios cerebrales como en la corteza y la subcorteza formando una red anastomósica. Estos dos sistemas

arteriales distribuyen cada una de sus ramas en áreas específicas del cerebro (Pebet, 2002).

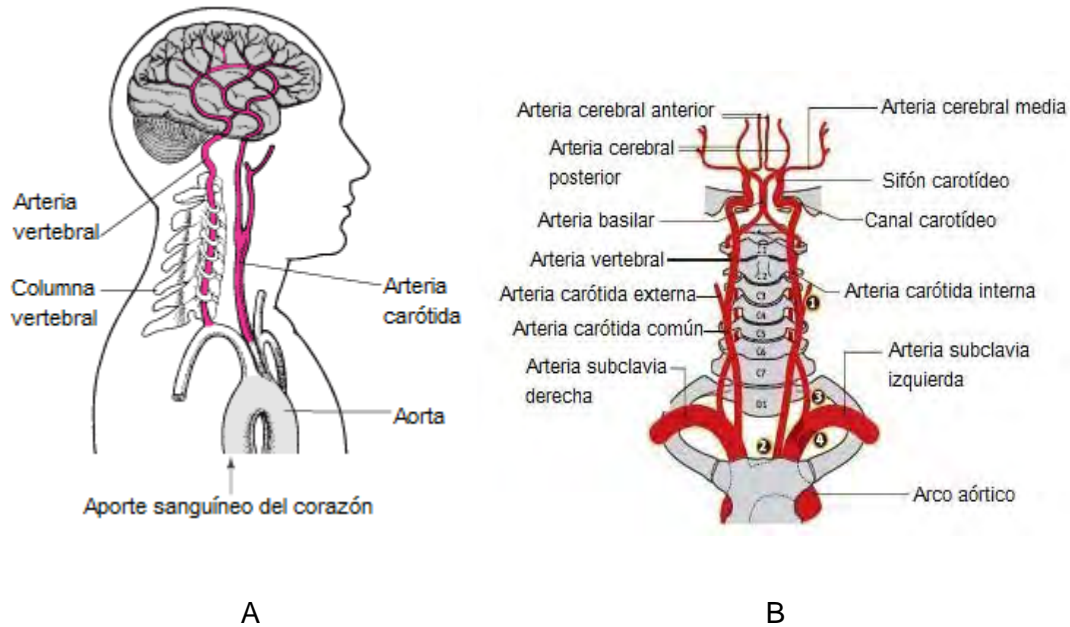


Figura 5. Sistemas de irrigación cerebral (tomado y modificado de: <http://www.virtualrespiratorycentre.com/diseases.asp?did=823&title=Stroke-Cerebrovascular-accident-CVA>; Marcus, 2004). El cerebro recibe irrigación sanguínea de dos sistemas importantes, el carotídeo y el vertebrobasilar (A). La figura B muestra como la arteria carótida interna (sistema carotídeo) se divide para formar la arteria cerebral anterior y media. La arteria basilar (sistema vertebrobasilar) al dividirse forma la arteria cerebral posterior. El polígono de Willis localizado en la base del cerebro es la comunicación a los dos sistemas de circulación. Complementariamente se representa 1 Arteria carótida interna proximal; 2 origen de la arteria carótida común; 3 origen de la arteria vertebral; 4 arteria subclavia.

Sistema carotídeo

Como su nombre lo indica este sistema esta formado por las arterias carótidas internas, éstas se dividen en la arteria oftálmica, arteria coroidea anterior, arteria cerebral anterior (ACA), arteria comunicante posterior (ACP) y arteria cerebral media (ACM) (Afifi, 2006). Esta última se considera como la rama principal o la continuación de la arteria

carótida interna. De manera conjunta, todas estas subdivisiones se encargan de irrigar los nervios ópticos y la retina; y la porción anterior de cada hemisferio cerebral que abarca los lóbulos frontal, parietal y la parte anterior del temporal.

Sistema vertebrobasilar

Este sistema esta constituido por las arterias vertebral y basilar. Las arterias vertebrales, dan origen a las ramas espinal posterior y anterior y cerebelosa posteroinferior. Las áreas irrigadas por estas áreas son parte del cerebelo, la médula oblongada, el bulbo raquídeo y la médula espinal. Por otro lado, la arteria basilar, formada por la unión de las dos arterias vertebrales, da lugar a las arterias cerebrales posteriores, quienes riegan la superficie inferior del lóbulo temporal y la superficie medial e inferior del lóbulo occipital.

Ahora bien, cuando alguna de estas arterias o sus ramas son bloqueadas por un émbolo, se produce una pérdida de funciones en las áreas cerebrales irrigadas, el 80 al 85 % de los eventos isquémicos ocurren en el sistema de circulación carotídeo (Futrell, 1996). Los efectos neurológicos dependerán del área cerebral afectada, la severidad y la duración del déficit sanguíneo y los procesos plásticos reparadores (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencias diagnósticas del Sistema Vertebrobasilar en contraste con el Sistema Carotídeo (tomado de Futrell, 1996). Las consecuencias neurológicas producidas por la isquemia cerebral dependen de la región cerebral afectada. En la clínica, la presencia o ausencia de signos o síntomas ayuda a conocer en qué sistema vascular se presentó la lesión. A continuación se indican algunos de los síntomas que caracterizan la afectación del sistema vertebrobasilar y carotídeo.

<i>Signos y síntomas</i>	<i>Sistema Vertebrobasilar</i>	<i>Sistema carotídeo</i>
Afasia	+/-	+
Disartria	+	+
Disfagia	+	+/-
Hemianopsia homónima	+	+
Amaurosis Fugaz	-	+
Vértigo	+	-
Diplopia	-	+
Hemiplejia sensorial	-	+
Hemiplejia motora	-	+
Nistagmus	+	-
Síncope	+/-	-
Hemiparesis	+	+
Negligencia unilateral	-	+

+ Presente

- Ausente

+/- Presente o ausente

En general clínicamente durante el proceso de isquemia cerebral, se presenta una gran variedad de alteraciones sensoriales y motoras, incluyendo temblor, pérdida de la coordinación y la fuerza muscular, alteraciones del balance y la postura, parálisis parciales (Sien et al., 2007), síncope, apraxia (dificultad para realizar movimientos voluntarios), negligencia unilateral y problemas de visión como hemianopsia homónima (ceguera en la mitad del campo visual de uno o dos ojos), amaurosis fugaz (infarto en la retina que produce ceguera por un lapso de tiempo) o diplopia (visión doble; Futrell, 1996) y problemas en la deglución de alimentos (disfagia). También se manifiestan disfunciones corticales que provocan una reducción intelectual entre las que destacan amnesia, desorientación en el espacio y/o el tiempo, demencia, delirium, problemas de atención, resolución de problemas y alteraciones en el lenguaje y en el habla como afasia y disartria que conllevan a una limitación en las habilidades para escuchar, leer y escribir (Tatemichi et al., 1994; Rogers et al., 1997).

Resulta evidente que ante tales alteraciones, los pacientes se enfrentan a la imposibilidad de realizar fácilmente sus actividades cotidianas simples como el aseo personal y la alimentación, lo cual puede inducir la aparición de enfermedades emocionales como la depresión, haciendo de esta forma más complejo el cuadro clínico y acelerando la muerte del paciente (Pohjasvaara et al., 2002; Narushima et al., 2007).

Mediante estudios de imágenes como la tomografía craneal computarizada por emisión de positrones (PET-CT), se ha reportado que áreas cerebrales afectadas por un evento isquémico pueden presentarse en ambos hemisferios cerebrales, ya sea en los ganglios basales (núcleo, caudado, putamen), el puente, el cerebelo, la corteza cerebral motora (Nelles, 2000), la corteza orbitofrontal, el tallo cerebral, el giro del cíngulo y el cuerpo calloso (Ledesma, 2007).

1.2.3 Modelos animales de isquemia cerebral

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la EVC es la tercera causa de muerte y la principal causa de discapacidad en la actualidad. La Organización Mundial de la Salud estima que en los próximos 20 años habrá 77 millones de personas con secuelas de EVC, de los cuales 61 millones requerirán rehabilitación. La magnitud de la carga económica que esta cantidad de pacientes supondrá a los sistemas de salud en el mundo hacen urgente la necesidad de desarrollar estrategias que permitan ofrecer nuevas alternativas terapéuticas a este grupo de pacientes (Durukan et al., 2008).

El conocimiento actual del daño neuronal durante y después de la isquemia cerebral, así como los trastornos conductuales que se presentan y los efectos protectores de algunos fármacos, están basados en modelos animales de isquemia cerebral que durante más de 35 años se han ido desarrollando (Dirnagl et al; 1999; Onténiente et al., 2003; Juurlink como se cita en Rodríguez, 2000). Los modelos experimentales que se emplean con mayor frecuencia en el estudio de la isquemia son principalmente dos: el modelo de isquemia focal y el modelo de isquemia global (Tabla 2). La meta de ambos tipos de modelos es reducir el aporte de oxígeno y glucosa al tejido cerebral, cada uno con una manera característica. La isquemia focal, se presenta cuando se ocluye una arteria específica como la arteria cerebral media (MCA), el grado o la distribución de la reducción del flujo sanguíneo depende de la duración de la oclusión, ya que puede ser permanente o transitoria (Traystman, 2003). Por otro lado, los modelos de isquemia global, por lo general del cerebro anterior, involucran un bloqueo transitorio (5-30 min) o permanente de las arterias carótidas comunes, lo que afecta áreas cerebrales muy extensas (Block, 1999; Rodríguez et al., 2000). Los animales más frecuentemente empleados para este tipo de modelos son roedores (jerbos, ratas y ratones) debido a que su uso tiene mayor aceptación ética, su manutención es poco costosa y son

genéticamente homogéneos. Además, se pueden emplear con mayor facilidad aparatos sofisticados para medir diferentes aspectos como la conducta sensorial y motora (Block, 1999; DeVries et al., 2001).

El uso de modelos experimentales de isquemia cerebral actualmente es una herramienta esencial para la comprensión de la patogénesis de la isquemia cerebral en humanos y para el diseño de métodos de prevención o tratamiento. En el siguiente cuadro se exponen las lesiones cerebrales isquémicas que algunos modelos tratan de reproducir.

Tabla 2. Modelos experimentales de isquemia cerebral. (Tomado de Prieto-Arribas, 2008)

Modelos de isquemia cerebral global en animales			Autor, año
Interrupción de la circulación cerebral	Interrupción completa de la circulación cerebral	Oclusión 2 vasos	Levine, 1966
		Oclusión 2 vasos + hipotensión/hipoxia	Eköf, 1972
		Oclusión 4 vasos	Pusinelli, 1979 Sugio, 1988
		Estrangulación cervical	Rabat, 1938
		Decapitación	Hinzen, 1972
	Interrupción incompleta de la circulación cerebral	Hipotensión arterial Estenosis de arterias carótidas comunes o mediante fístula arteriovenosa	Shibata, 2004 Hai, 2002
		Hipertensión intracraneal	Siesjö, 1970
Modelos de isquemia cerebral focal en animales			
Oclusión de la arteria carótida común	Oclusión de la arteria carótida común	Nelly, 2001 Levine, 1966	
	Encefalopatía anóxica-isquémica	Levine, 1960	
Oclusión de la arteria cerebral media	Oclusión transorbital	Hudgins, 1970 Hossman, 1980	
	Oclusión intraluminal mediante un filamento	Koizumi, 1986 Zea Longa, 1989 Belayev, 1996 Smith-Elsaesser, 1998	
	Oclusión intraluminal mediante embolia de coágulo de sangre autógeno o heterólogo	Overgaard, 1992 Overgaard, 1994 Zhang, 1997	
Oclusión microvascular de la arteria cerebral media	Oclusión fototrombótica	Watson, 1985	
	Agregados plaquetarios	Fieschi, 1975	
	Inyección intracraneal de endotelinas (tipos 1 y 3)	Sharkey, 1995 Henshall, 1999	
Infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas			Yamori, 1976

1.3 Modelo de Sección Secuencial de las Arterias Carótidas Comunes

Actualmente gran parte de la investigación de la isquemia cerebral se ha encaminado al diseño de un tratamiento neuroprotector cuyo fin es evitar la muerte neuronal del tejido nervioso localizado en el área de penumbra isquémica (Pérez, 2002). Numerosos fármacos que actúan a diferentes niveles de la cascada isquémica han sido investigados en modelos animales, demostrando eficacia en la reducción del tamaño de infarto cerebral isquémico, sin obtener resultados satisfactorios al trasladarlos a la clínica humana (Cheng, 2004; Castillo, 2003). Esta situación generó críticas en las consideraciones metodológicas de los modelos, y también el desarrollo de nuevos modelos experimentales que se aproximen a lo que ocurre en la clínica durante un evento isquémico. Dentro de estos nuevos métodos experimentales, se encuentra el modelo de sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC) desarrollado en el laboratorio del Dr. Rodríguez Carranza (2000). El SSACC es un modelo de isquemia global incompleta debido a que la interrupción de la circulación sanguínea, afecta únicamente al sistema carotídeo (Fig. 6), permaneciendo constante la circulación del sistema basilar encargada de irrigar los centros reguladores de funciones vitales como la respiratoria y la cardiovascular. El procedimiento experimental se divide en dos etapas, la primera consiste en ligar y seccionar la arteria carótida común izquierda; en la segunda etapa, que se realiza 32 días después, se liga y secciona la arteria carótida derecha.

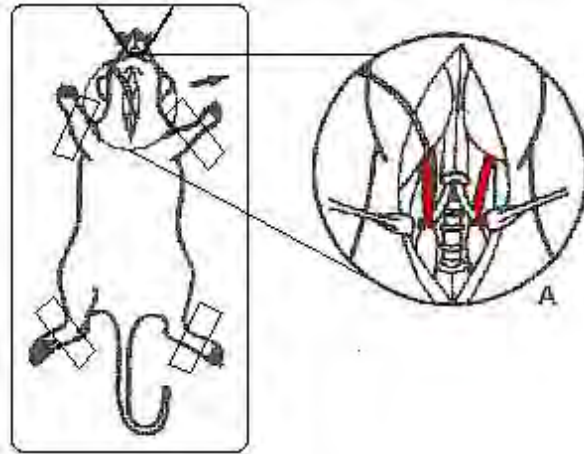


Figura 6. Esquema representativo de un animal experimental sometido a SSACC. El animal es fijado de su tren anterior y superior así como de sus dientes para evitar su movimiento durante la cirugía y exponer el área del cuello donde se realizará la incisión. A: ilustra las arterias carótidas comunes (Tomado de Roda, 1998) en donde se llevará a cabo la ligadura y corte.

1.3.1. Características de SSACC

Este modelo tiene diferencias básicas con los modelos tradicionales de isquemia cerebral. En primer lugar, el uso de animales de experimentación viejos (9-12 meses) y por lo tanto más susceptibles al daño isquémico (Fuentes-Vargas et al., 2002), en analogía con la población que presenta con más incidencia esta enfermedad. En segundo lugar, el intervalo de 32 días entre la oclusión de las arterias carótidas comunes, hace posible generar un estado de perfusión crónicamente reducida antes de la segunda ligadura para así lograr animales que presenten eventos isquémicos previos tal y como ocurre en algunos pacientes con EVC. Además, se ha observado que el corte de la primera carótida produce un incremento notable en el diámetro de las arterias que constituyen el polígono de Willis y la generación de nuevos vasos, la explicación dada a este hecho es que la disminución del flujo cerebral es compensada por el aumento del diámetro en las arterias, lo cual constituye la tercer característica distintiva del modelo de

SSACC. Estos eventos prolongan el tiempo de vida de los animales lo cual ayuda al estudio de alteraciones conductuales y déficits neurológicos; así como el estudio de fármacos capaces de modificar dichas alteraciones (Rodríguez et al., 2000; Rodríguez et al., 2003a). Por último, es importante agregar que con el empleo de este modelo se demostró que el dexrazoxano tiene efectos neuroprotectores excepcionales (Rodríguez et al., 2003b).

1.4 Alteraciones neurológicas y conductuales inducidas por SSACC

La identificación y caracterización de las alteraciones neurológicas y conductuales inducidas por la isquemia cerebral aguda se ha convertido en una importante actividad experimental donde se refleja la influencia de las manipulaciones farmacológicas, como ya se mencionó anteriormente una gran cantidad y variedad de fármacos han sido capaces de disminuir el tamaño del infarto en animales, pero han fracasado en los pacientes con EVC (Green et al., 2003). En el caso de la isquemia cerebral aguda inducida por SSACC, se inició una investigación con el fin de identificar la presencia o ausencia de alteraciones neurológicas que se presentaban después del corte secuencial de las arterias carótidas comunes mediante una escala que determinaba distintos niveles de disfunción, los resultados indicaron la presencia de 10 alteraciones consistentes y definidas: incoordinación motora, posición corporal anormal (lateralizada), hipomotilidad, disminución del tono y la fuerza muscular, temblor, encorvamiento, flexión de la extremidad anterior y marcha atáxica (Rodríguez et al., 2005).

A diferencia de otros modelos de isquemia, el modelo de SSACC induce una gran cantidad de alteraciones neuroconductuales que ofrecen la oportunidad de evaluar el impacto funcional de la isquemia cerebral aguda y su posible recuperación después de la administración de fármacos neuroprotectores (Rodríguez et al., 2003b). En este sentido, se decidió como siguiente paso, identificar las alteraciones neuroconductuales más

sobresalientes provocadas por la sección de las arterias carótidas comunes para determinar la eficacia de los fármacos empleados. La primera alteración caracterizada fue la actividad locomotora; los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de la actividad locomotora, tanto exploratoria como espontánea, en los animales con sección de carótidas, comparados con los animales control (Santiago-Mejía et al., 2004), sin embargo los animales que recibieron tratamiento farmacológico mostraron un aumento en la actividad locomotora en contraste con los animales administrados con solución salina (vehículo). Un patrón similar se presentó cuando se evaluó la conducta en el Rota rod, pues después de la segunda cirugía, los animales que recibieron vehículo, invirtieron menor tiempo en el rota rod que aquellos a los que se les administró fármaco. Posteriormente, se estudió el efecto de la isquemia cerebral aguda sobre la sensibilidad táctil de los ratones, colocando un trozo de cinta adhesiva en la superficie plantar de una de las extremidades delanteras. Se encontró que la isquemia cerebral aguda inducida por SSACC aumenta significativamente el tiempo requerido por el roedor para retirar la cinta adhesiva, lo cual sugiere que la sensibilidad táctil de los ratones isquémicos está disminuida (Gómez C, et al., 2005). Considerando que la incoordinación motora y la parálisis de la extremidad anterior son dos de las alteraciones más comunes y persistentes en la isquemia producida por SSACC, se procedió a evaluar la capacidad de los animales isquémicos para manipular, abrir y consumir una semilla de girasol. Los resultados obtenidos señalaron que los animales isquémicos presentan alteraciones motoras finas (patas anteriores y falanges) que les impiden sostener y manipular la semilla de girasol (Gómez et al., 2006).

1.5 Conducta de nado

La identificación y caracterización de las consecuencias del daño isquémico en la conducta motora ha sido poco estudiado en roedores, debido a que muchos de los efectos pueden ser sutiles y difíciles de identificar. Esto ha retrasado la obtención de medidas de la capacidad funcional de los animales que proporcione evidencia significativa para determinar la presencia, severidad y el transcurso de las alteraciones, así como las consecuencias de la intervención farmacológica. Ante este panorama y por la capacidad nata de los roedores al nado, se consideró probar la conducta de nado como un modelo que pueda brindarnos un panorama más amplio del las alteraciones generadas por el procedimiento de SSACC. Hasta el momento ninguno de los modelos de isquemia cerebral ha empleado la conducta de nado para caracterizar las alteraciones motoras que se presentan en los animales de experimentación. Brevemente se explica a continuación, la conducta de nado es una modificación del modelo del laberinto de agua de Morris (1984) cuya tarea consiste en que los roedores suban a la plataforma para salir del agua y escapar de la necesidad de seguir nadando, la desventaja principal del modelo radica en el hecho de que la inmersión en el agua puede aumentar el nivel de estrés de los animales, lo cual podría influir en su ejecución (Vicens, 2003).

1.6 Evaluación del daño isquémico en el Modelo de SSACC

La evaluación de la lesión isquémica inducida en los modelos experimentales, es importante para determinar la eficacia que los tratamientos farmacológicos ejercen para reducir la lesión. Dentro de los métodos histopatológicos empleados para la evaluación del daño isquémico cerebral se encuentra el TTC, un colorante que tiñe de rojo el tejido sano al reaccionar con las mitocondrias activas (Prieto-Arribas, 2008). El estudio histopatológico con TTC de los animales sometidos al corte secuencial de las arterias carótidas comunes, señala que el daño cerebral se presenta en ambos hemisferios, no

obstante es en el derecho donde se presenta de forma más marcada. Las áreas de infarto corresponden a la corteza frontoparietal, el estriado, el cerebelo y el hipocampo en sus áreas CA1, CA2, CA3 Y CA4 (Rodríguez et al., 2000).

1.7 Fármacos Neuroprotectores

Las investigaciones dedicadas al estudio del efecto de numerosos fármacos en el infarto cerebral, se han enfocado en abordar una protección celular temprana en donde se mantenga el flujo sanguíneo cerebral adecuado para la demanda metabólica, por medio de la interrupción de la compleja cascada de eventos que se inician durante la isquemia y que llevan a la muerte celular. Por ello el principal objetivo de estos fármacos (llamados neuroprotectores) consiste en frenar la cascada isquémica y reducir la cantidad de tejido dañado (Chávez, 2005), para no sólo aumentar la sobrevivencia del paciente sino también para mejorar su calidad de vida. Las modalidades terapéuticas desarrolladas van dirigidas a intervenir en diversos puntos susceptibles de la cascada, sin embargo hasta el momento no existe evidencia suficiente de un tratamiento neuroprotector eficaz (Castillo, 2003). Algunos fármacos probados en animales han mostrado reducir el volumen del infarto, pero el traslado de estos resultados a pacientes no ha sido suficientemente satisfactorio ya que éstos son parcialmente positivos o causan efectos adversos importantes (ver tabla 3). La única terapia aprobada para el infarto cerebral hasta el momento es la administración del activador tisular del plasminógeno (tPA) agente trombolítico cuyo mecanismo es recanalizar el vaso obstruido para restablecer el flujo cerebral. Para obtener resultados eficaces, este fármaco debe administrarse dentro de las primeras tres horas posteriores al evento isquémico (Pérez, 2002). La principal desventaja que este fármaco presenta además de su estrecha ventana terapéutica es el riesgo de que los pacientes presenten una hemorragia cerebral, especialmente en aquellos a quienes se les administra posterior a tres horas (Culmsee, 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, un componente tóxico final de la isquemia cerebral es la producción masiva de radicales libres. Por ello, se ha investigado el efecto neuroprotector de moléculas con propiedades antioxidantes; es decir, sustancias capaces de impedir el proceso oxidativo. A nivel experimental estos fármacos son muy eficaces para disminuir el tamaño del infarto (Hall, 1997). Sin embargo, todos han fracasado en los ensayos clínicos controlados, algunos porque no tienen propiedades neuroprotectoras y otros porque las dosis necesarias son muy altas, no toleradas por los pacientes.

Estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. Rodríguez Carranza en la facultad de Medicina de la UNAM han sugerido que el dexrazoxano es un fármaco con potencial efecto neuroprotector debido a su capacidad para disminuir la mortalidad inducida por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes (Rodríguez et al., 2000). Asimismo, en un estudio posterior se observó que la administración de dexrazoxano protege a los ratones de las alteraciones neurológicas (hipomotilidad e incoordinación motora) inducidas por SSACC (Rodríguez et al., 2003). El dexrazoxano es un derivado del ácido etilén diamino tetracético que tanto en animales de laboratorio como en pacientes con cáncer reduce la toxicidad cardiaca producida por la doxorubicina (Wiseman et al., 1998). Con respecto a su mecanismo de acción, se ha demostrado que este fármaco se hidroliza en el interior de las células a su forma abierta, la cual tiene propiedades quelantes y forma complejos con el hierro, por lo que inhibe la formación de radicales libres. Considerando la evidencia obtenida hasta ahora, acerca del potencial efecto neuroprotector del dexrazoxano, se decidió utilizar este fármaco en el presente trabajo para evaluar su efecto sobre la incoordinación motora inducida por la SSACC a través de la prueba de conducta de nado.

Tabla 3. Fármacos neuroprotectores probados en el tratamiento clínico de isquemia y los efectos que han producido (Tomado y modificado de Castillo, 2003).

Fármacos neuroprotectores ensayados en humanos		
	Beneficio	Efectos adversos
<i>Inhibidores de la liberación de glutamato</i>		
Fosfenitoína	-	-
Lubeluzole	±	+
Lifarizina	-	+
<i>Antagonistas de los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes</i>		
Nimodipino	±	+
Flunaricina	±	-
Nicardipino	±	+
Isradipino		+
<i>Antagonista de los receptores NMDA</i>		
Selfotel	-	+
Dextrofan	-	+
Aptiganel	-	+
Eliprodil	-	-
Gavestinel	-	-
Dizolcipina	-	+
NBQX	-	+
<i>Hiperpolarizantes de las membranas neuronales</i>		
Clometiazol	±	-
MaxiPost	-	-
<i>Antioxidantes</i>		
Tirilazad	-	+
Ebselen	+	-
<i>Protectores de membranas celulares</i>		
Citicolina	±	-
Pirecetam	+	-
<i>Antiinflamatorios</i>		
Enlimomab	-	+
Hu23F26	-	+

+Beneficio

- Efecto adverso

+/- Beneficio con efecto adverso

2. Razonamiento científico

2.1 Planteamiento del problema. Justificación

La enfermedad vascular cerebral aguda es una de las causas más frecuentes de muerte y de discapacidad cognoscitiva en la población adulta. A la fecha, el tratamiento de los pacientes con isquemia cerebral aguda se restringe a la aplicación de medidas generales de mantenimiento y al uso de un fármaco: activador de plasminógeno tisular, (tPA), que debe administrarse durante las primeras 3 horas postinfarto (Bramlett, 2004). Existen muchas moléculas con propiedades neuroprotectoras en animales de laboratorio, capaces de reducir el daño estructural (volumen del infarto) producido por la isquemia cerebral, pero que no reducen la mortalidad, ni limitan la disfunción neurológica de los pacientes con infarto cerebral.

Las críticas a varios de los modelos experimentales empleados en el estudio de la isquemia cerebral se puede resumir de la siguiente forma: a) uso de animales jóvenes, cuando la EVC es propia de los viejos; b) uso de animales sanos, cuando el fenómeno isquémico usualmente ocurre en cerebros crónicamente isquémicos; c) se cuantifica el tamaño del infarto como criterio de daño para determinar el efecto neuroprotector, cuando en la clínica los puntos de referencia más importantes son la sobrevida, la discapacidad neurológica y la recuperación funcional de los pacientes. Esta diferencia en la forma de evaluar el daño cerebral y el efecto neuroprotector es particularmente importante y fue considerada especialmente en el desarrollo del modelo experimental de isquemia cerebral aguda que se empleó en el presente trabajo.

En resumen, los fármacos capaces de reducir el efecto del infarto cerebral isquémico en animales de laboratorio carecen de eficacia clínica. Esta falta de correlación entre los resultados de los estudios preclínicos y los ensayos clínicos cuestiona el valor

predictivo de los modelos tradicionales de isquemia cerebral, y la carencia de neuroprotectores clínicamente útiles, justifica el interés en la caracterización de las alteraciones neurológicas y conductuales de modelos alternativos, como el del corte secuencial de las arterias carótidas comunes, ya que éste mantiene una estrecha relación con el fenómeno isquémico humano.

Estudios previos han mostrado que el corte secuencial de las arterias carótidas comunes en los ratones produce un patrón reproducible de mortalidad, daño cerebral extenso y una amplia variedad de alteraciones neuroconductuales. De éstas, la incoordinación motora y la parálisis de la extremidad anterior son dos de las alteraciones neurológicas más consistentes. En el procedimiento utilizado, la incoordinación motora fue evaluada en términos de la capacidad de los ratones para moverse y permanecer en una superficie inclinada, y en su habilidad para sujetarse de una cuerda con sus patas y su cola. Asimismo, se consideró parálisis de la extremidad superior cuando los ratones fueron incapaces de extender completamente la pata para sujetarse a una malla de alambre al ser tomados por la cola. Considerando que estas pruebas no nos permiten evaluar la presencia, severidad y curso temporal de las alteraciones motoras inducidas por la isquemia cerebral aguda producida por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes, decidimos buscar una prueba que nos permitiera evaluar la coordinación motora de los ratones. En este sentido, estudios realizados por otros grupos de investigación señalan que la conducta de nado es un buen método para evaluar la coordinación motora de los roedores. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar las alteraciones motoras inducidas por el corte secuencial de las arterias carótidas comunes en la conducta de nado.

2.2 Hipótesis

La isquemia cerebral causada por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes produce alteraciones motoras en la conducta de nado de los ratones.

Existe una relación directa entre el déficit conductual y el daño morfológico causado por la isquemia cerebral inducida por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes.

2.3 Objetivos

1. Identificar y caracterizar las alteraciones motoras inducidas por la isquemia cerebral causada por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes.
2. Establecer la relación entre el déficit neurológico y el daño morfológico de la isquemia cerebral causada por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes.
3. Postular el empleo del modelo de conducta de nado para la búsqueda de fármacos capaces de disminuir la discapacidad o favorecer la recuperación funcional

3. Material y métodos

3.1 Animales

Se utilizaron ratones macho envejecidos (40 a 60 semanas de edad) de la cepa CFW (obtenidos inicialmente de la casa Taconic Farms, Germatown, NY), de 35 a 55 g de peso corporal, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron colocados en grupos de 3 a 5 ratones (de la misma camada) por jaula en un cuarto de temperatura controlada ($22\pm^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $55\pm 3\%$), con un ciclo de luz-oscuridad normal (luz de 8 a.m. a 8 p.m.), con acceso libre al agua y alimento (Purina chow, México, DF.). Se permitió que los animales se aclimataran a estas condiciones ambientales por lo menos una semana previa a los experimentos. La cirugía y las evaluaciones conductuales se desarrollaron entre las 9:00 y las 14:00 horas. Todos los experimentos fueron realizados conforme a la ética experimental de la Declaración de Helsinki y a lo establecido en el Reglamento de la Ley General en Materia de Investigación para la Salud de México (Secretaría de Salud, 1987).

3.2 Procedimiento quirúrgico

Para lograr la isquemia cerebral se realizó el corte secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC) con el método descrito por Rodríguez et al. (2000). Brevemente, el procedimiento consistió en realizar bajo anestesia con éter, una incisión en la cara anterior del cuello, separar cuidadosamente la arteria carótida común izquierda del nervio vago y, excepto en el grupo sham, seccionar entre dos ligaduras; en ambos casos, la incisión se cerró con hilo quirúrgico. Después de la cirugía, los animales fueron colocados en un área de recuperación, manteniendo su temperatura corporal con lámparas incandescentes. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia se regresaron a sus jaulas originales. Treinta y dos días después, se realizó el mismo

procedimiento quirúrgico para ligar y cortar la arteria carótida común derecha. Antes de la primera cirugía, los animales fueron asignados de manera aleatoria a los diferentes grupos experimentales (control, sham, SSACC). Como grupos control se utilizaron ratones sin anestesia ni cirugía, y ratones con anestesia y procedimiento quirúrgico, excepto ligadura y corte de las carótidas (grupo sham; Fig. 7).

3.3 Mortalidad

Después de la primera y segunda cirugía se registró continuamente el número de muertes hasta el fin del experimento (96 hrs). Estos datos se utilizaron para calcular las curvas de supervivencia.

3.4 Modelo de conducta de nado

El procedimiento para evaluar la función motora es una adaptación del modelo descrito por Morris (1984), empleado para el estudio de alteraciones en las funciones cognitivas y efectos de lesiones cerebrales. En este trabajo se utilizó una piscina rectangular (15x25x80 cm) de acrílico transparente ubicada en un cuarto bajo condiciones de oscuridad. Se empleó una plataforma circular negra de polietileno (9.0 cm de diámetro x 9.5 cm de altura) que fue colocada en uno de los extremos de la piscina. El nivel del agua se mantuvo al nivel de la plataforma a una temperatura de 20° C.

3.5 Diseño experimental

Antes de la primera cirugía, los animales se evaluaron diariamente a través de la conducta de nado durante 5 días consecutivos. El registro del quinto día fue considerado como el valor basal para cada animal. Los siguientes registros se llevaron a cabo a las 24, 48 y 72 h después de cada cirugía. Durante el intervalo de los 32 días, la conducta se realizó una vez por semana para evitar que los animales olvidaran la conducta.

El tiempo límite para encontrar y subirse a la plataforma fue de 90 segundos, si transcurrido este tiempo el ratón no logró encontrar la plataforma o la encontró pero no logró subirse, entonces se colocó en ella por un lapso de 10 segundos. La conducta se registró utilizando el sistema computarizado HVS Image que proporcionó los siguientes valores:

i. Latencia. Tiempo transcurrido desde que el animal se colocó en el agua hasta que subió a la plataforma.

ii. Distancia. Metros recorridos por el roedor durante la prueba.

iii. Velocidad. Relación entre la distancia recorrida y tiempo empleado para la ejecución de la prueba.

iv. Porcentaje de flotación. Porcentaje de tiempo en que el animal permaneció sin movimiento en el agua.

Cada una de las ejecuciones realizadas por los animales fue videograbada, las grabaciones fueron analizadas en formato lento para obtener los siguientes datos: el ángulo de nado con respecto al nivel del agua, el tipo de nado (recto o zigzag), si toca las paredes de la piscina, si toca la plataforma y regresa, si presenta hundimiento, rotación, lateralización, flexión de extremidades anteriores o movimiento del tren anterior. Al final de cada evaluación los ratones se colocaron en una caja seca con lámpara de luz incandescente hasta que recuperaron su temperatura corporal, posteriormente se regresaron a sus cajas.

3.6 Prueba Farmacológica

Se determinó el efecto del dexrazoxano, administrado 15 minutos después de la segunda cirugía por vía i.p. a dos niveles de dosis: una baja (32 mg/kg) y una dosis alta

(128 mg/kg) así como vehículo en los ratones pertenecientes al grupo SSACC. La administración del fármaco se realizó de manera aleatoria. Todos los ratones del grupo sham recibieron solución salina.

3.7 Análisis histológico

Al término de la prueba conductual (96 h después de la segunda cirugía), los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (47 mg/Kg) administrada vía intraperitoneal. Cada ratón fue decapitado, se extrajeron de forma cuidadosa sus encéfalos y se colocaron en el refrigerador por 10 minutos para facilitar su manipulación. Posteriormente se insertaron en una matriz de cortes coronales (1 mm) para realizar los cortes a nivel del bulbo olfatorio hasta el cerebelo. Los cortes se colocaron en una solución al 2% de clorhidrato de Trifeniltetrazodion (TTC) por 30 minutos (Khan, 2000). Se consideró como tejido dañado a aquel que permaneció sin teñir. Inmediatamente después de transcurrido el tiempo, los cortes se colocaron en una caja de petri con solución salina donde cada uno fue fotografiado empleando una cámara digital para microscopio estereoscópico Olympus SZ61 con el fin de delimitar la región de infarto cerebral.

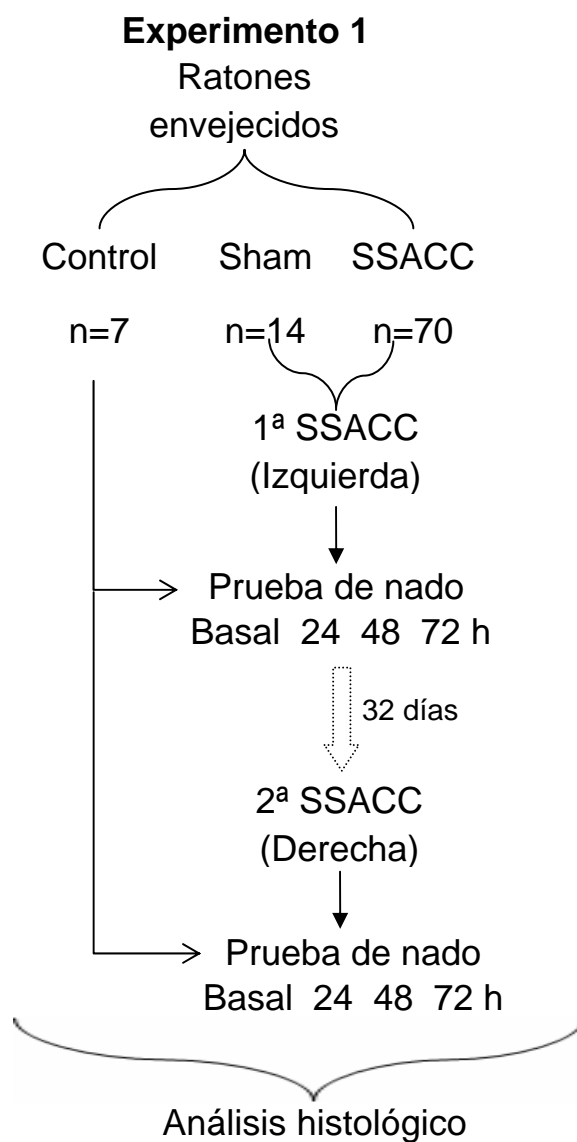
3.8 Análisis estadístico

Se realizó el cálculo de las curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon usando la prueba de rangos logarítmicos. Mediante la obtención de la prueba Q-Q para cada una de las variables cuantitativas a través de un programa estadístico, se decidió el uso de pruebas no paramétricas ya que los datos no se distribuyeron como la curva de la normal. Para la comparación estadística de la ejecución de nado (latencia, distancia, velocidad y tiempo de flotación) entre los grupos control, sham y SSACC se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente se aplicó la prueba

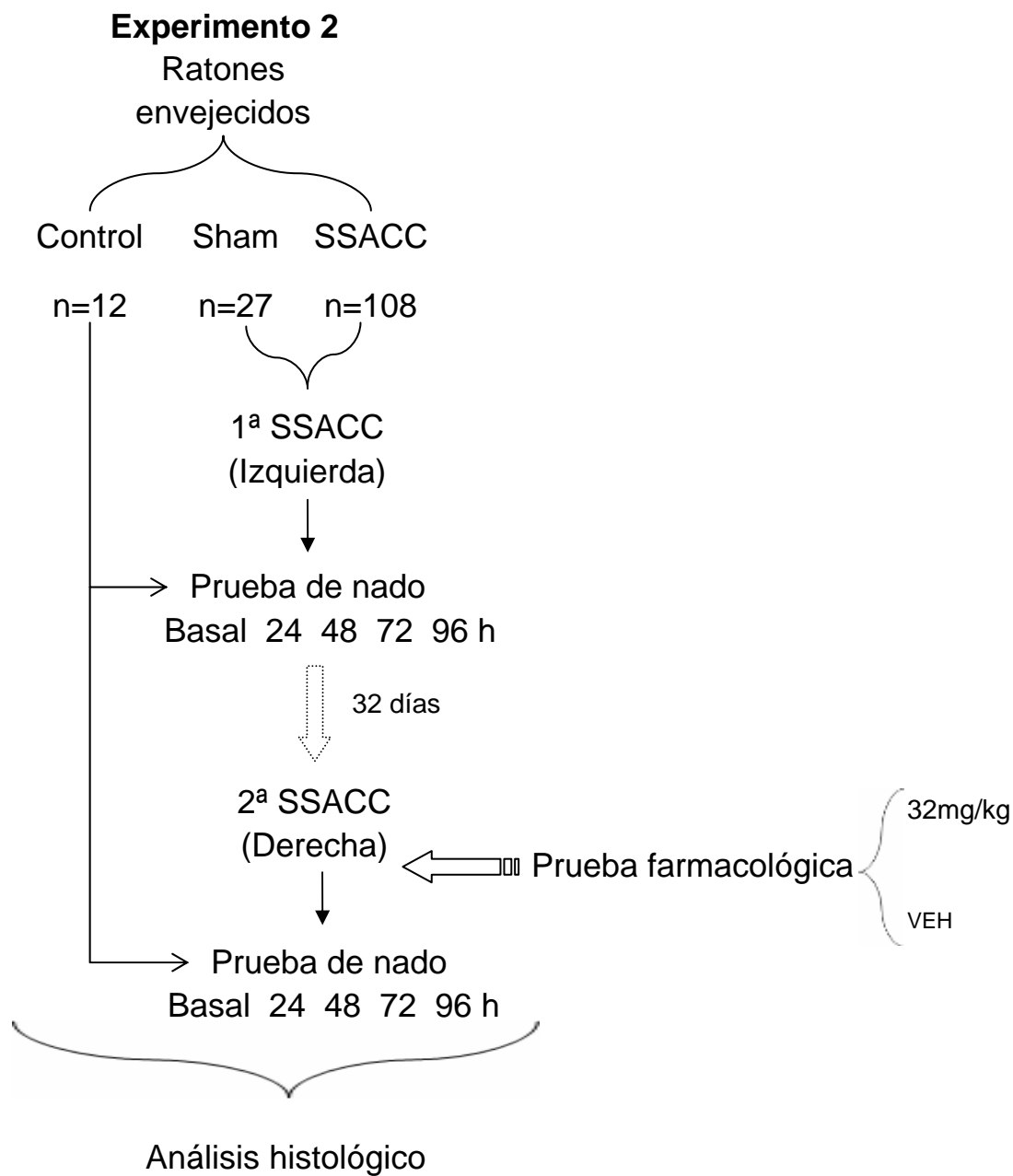
U-de Mann-Whitney mediante la cual se comparó el efecto de la cirugía entre la ejecución de nado de los grupos sham y SSACC. Esta misma prueba se aplicó para comparar las diferencias entre la ejecución de nado del grupo SSACC sin tratamiento (experimento preliminar) y con tratamiento (experimento 2). Los datos obtenidos durante las horas de evaluación (24, 48, 72, 96 h) de cada grupo fueron comparados con el valor correspondiente a sus basales (antes de las cirugías) empleando la prueba pos hoc de Dunn. En todos los casos, un valor de probabilidad menor de 0.05 indicó significancia estadística.

Figura 7. Esquema del diseño experimental utilizado.

A. La prueba de nado basal se realizó previo a cada cirugía.



B. Quince minutos después de la segunda cirugía el fármaco fue administrado únicamente al grupo SSACC vía intraperitoneal bajo tres dosis diferentes 32mg/kg, 128mg/kg y vehículo (solución salina).



4. Resultados

4.1 Experimento preliminar. Caracterización de la conducta de nado de los animales con isquemia cerebral aguda inducida por la SSACC.

4.1.1 Mortalidad.

Primera cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda.

No se registraron muertes en los animales del grupo control (n= 7). El grupo sham (cirugía sin ligadura) presentó sólo un deceso 24 h después de la cirugía (1/14), su porcentaje de sobrevivida correspondió al 78.57%. De los 71 ratones que componían al grupo SSACC, 12 murieron a las 24 h (83.09%), y tres más a las 72 h, el porcentaje de sobrevivida final para este grupo fue de 78.87% (Fig.8).

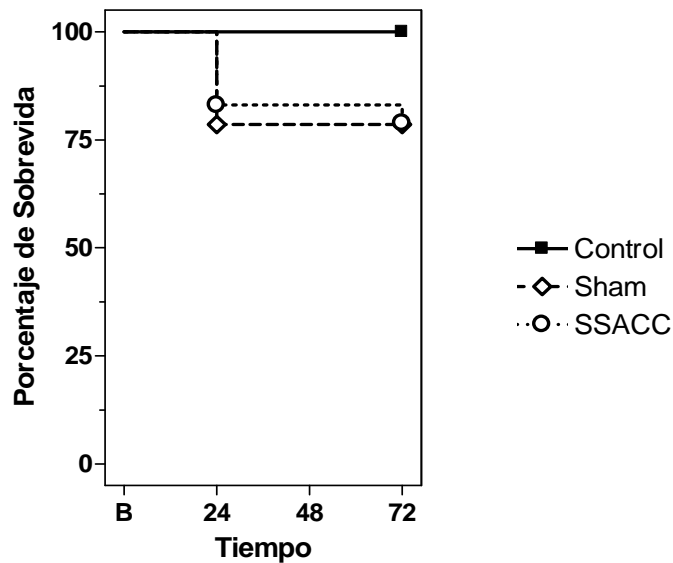


Figura 8. Porcentaje de sobrevivida registrada después de la primera cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía, las ordenadas el porcentaje de sobrevivida. Las curvas fueron calculadas por el método Kaplan-Meier. No se encontraron diferencias significativas.

Segunda cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía.

El número de animales de los grupos control y sham permaneció igual al cabo de los 32 días entre ambas cirugías, por ello los porcentajes de supervivencia para ambos grupos fueron considerados del 100%, y así se conservaron hasta el fin del experimento (Fig.9). La mortalidad del grupo SSACC durante las primeras 24 h después de la cirugía redujo su porcentaje de supervivencia a 22.92% (37/48), la siguiente disminución en la muestra se produjo en el último registro de las 72 h, donde el porcentaje de supervivencia fue de 20.83% representando una población integrada por 10 sujetos. La comparación entre las curvas fue significativa al $*p < 0.005$.

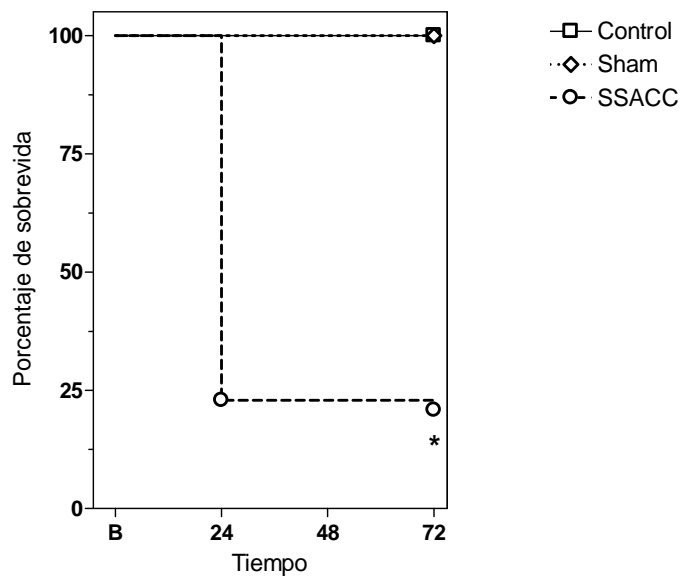


Figura 9. Curvas de supervivencia de los grupos experimentales correspondientes a la segunda cirugía. Las curvas fueron comparadas mediante la prueba de rangos logarítmicos, $*p < 0.005$.

4.1.2 Conducta de nado

Primera Cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda.

Los parámetros conductuales registrados durante la observación de la conducta de nado después la primera intervención quirúrgica fueron los siguientes:

i. Latencia. Tiempo empleado para realizar la prueba

El tiempo que emplearon los tres grupos experimentales (control, sham y SSACC) en llegar a la plataforma no presentó diferencias significativas durante la medición basal y a las 24 h, 48 h y 72h después de la primera cirugía (Anexo.1 información estadística).

En relación con el grupo control disminuyó su tiempo de llegada a la plataforma en cada uno de los registros, el tiempo final alcanzado fue de 4.25 seg (N.S. $p > 0.05$; Dunn; $n=7$).

El grupo sham (manipulación de arteria carótida) presentó una tendencia similar al grupo control, sin embargo sólo a las 48 h la disminución fue significativa ($*p < 0.05$; Dunn; $n=11-14$; Fig.10).

Por su parte el grupo SSACC disminuyó ligeramente su tiempo 24 h después del corte de la arteria carótida izquierda, el tiempo obtenido en este registro fue el más alto. En contraste, a las 48 y 72 h, el tiempo de latencia fue significativamente menor en comparación de su basal: la mediana de los tiempos fue de 5 y 5.35 seg respectivamente ($*p < 0.01$; Dunn; $n=56-71$).

La comparación de los tiempos de latencia entre los grupos sham y SSACC, no presentó diferencias significativas después del primer corte de la arteria carótida izquierda.

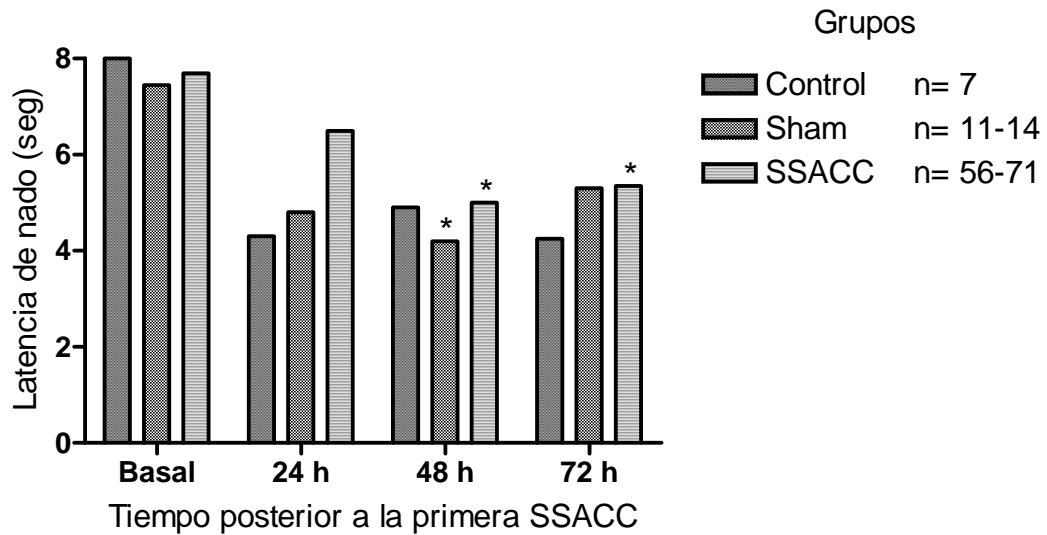


Figura 10. La gráfica muestra las medianas de los tiempos de latencia en que los grupos experimentales realizaron la tarea. La abscisa representa el tiempo después de la primera cirugía y la ordenada la latencia expresada en segundos. * Diferente con respecto a su basal ($p < 0.05$; Dunn).

ii. Distancia recorrida durante la prueba

Los tres grupos experimentales, recorrieron distancias similares para llegar a la plataforma antes (basal) y después de la primera cirugía (24, 48 y 72 h). Estos datos no obtuvieron diferencias significativas.

El grupo control disminuyó su distancia recorrida inicial a las 24 h, misma que mantuvo en los registros de las 48 y 72 h (N.S. $p > 0.05$; Dunn; $n=7$).

Los ratones del grupo sham recorrieron una distancia similar al grupo control tanto en los registros basales como en las 24, 48 y 78 h posteriores, sin embargo a las 48 h la distancia disminuyó significativamente (0.72m; $*p < 0.05$; Dunn; $n=11-14$; Fig. 11). Después del corte de la arteria carótida izquierda (24 h), el grupo sham llegó a la plataforma recorriendo una distancia similar a su basal, en contraste, se presentó una

reducción significativa a las 48 y 72 h posteriores de 0.74 y 0.76 m con respecto a su basal (*p< 0.001; Dunn; n=11-14).

La comparación del recorrido realizado entre los grupos Sham y SSACC no presentó diferencias significativas.

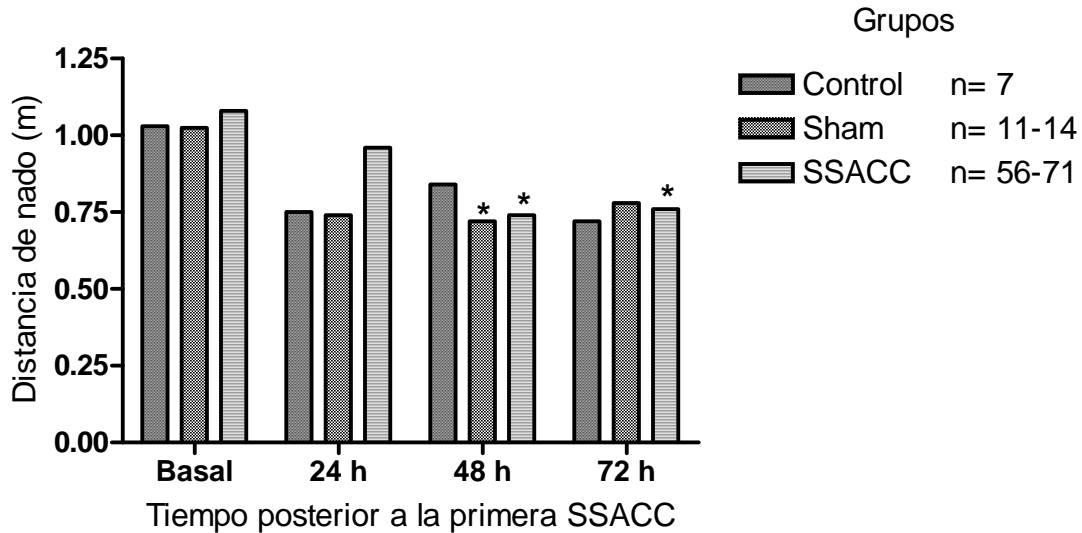


Fig.ura 11. La gráfica muestra la mediana de la distancia recorrida durante la prueba de nado (m), obtenida a las 24, 48 y 72 h después de la primera cirugía en los tres grupos experimentales. * p<0.05 con respecto a su valor basal (Dunn).

iii. Velocidad empleada en la prueba.

El análisis estadístico de los datos, indicó que únicamente se presentaron diferencias significativas entre los tres grupos (control, sham y SSACC), 24 h después de la primera cirugía (*p=0.009).

Los grupos control y sham obtuvieron valores de velocidad similares por encima de su basal en el registro de 24 h. A las 48 h el grupo sham disminuyó su velocidad, la cual conservó a las 72 h; mientras que el grupo sham incrementó su velocidad a las 48 h, regresando a su valor basal al término del experimento (72 h).

Por otro lado, los animales del grupo SSACC conservaron la velocidad basal en los registros posteriores a la primera cirugía.

No se generaron diferencias estadísticamente significativas entre la velocidad obtenida del grupo sham contra el grupo SSACC (Fig. 12).

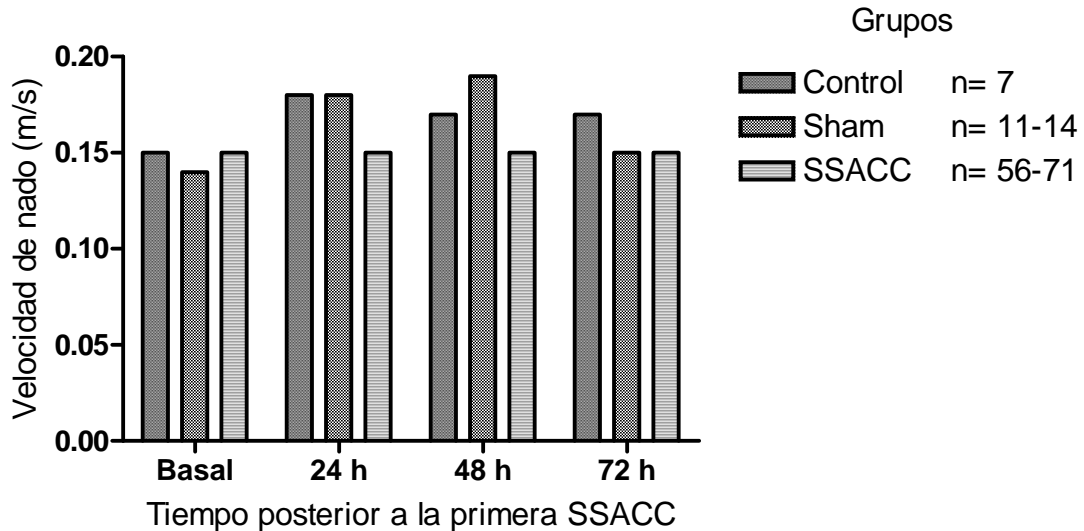


Figura 12. Registro de la velocidad de los tres grupos experimentales a las 24, 48 y 72 h después de la primera cirugía. * $p < 0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn).

iv. Porcentaje de flotación. Tiempo de inactividad dentro del agua.

El tiempo que permanecieron los ratones de los tres grupos sin realizar movimientos dentro del agua (o en flotación) fue similar, ya que tanto en el registro basal como en las 24, 28 y 72 h de realizado el corte de carótida, no se presentaron diferencias significativas.

Los ratones del grupo control mantuvieron un decremento gradual en el tiempo de inactividad de las 24 y hasta las 48 h con respecto a su basal, sin embargo a las 72 h se generó un aumentó en el tiempo que permanecieron sin movimiento dentro del agua.

Los ratones que solamente se les manipuló la arteria carótida izquierda (sham) redujeron mínimamente su tiempo de inactividad a las 24 h en comparación de su basal, ya que en los registros posteriores (48 y 72 h) el tiempo en que no realizaron movimientos, aumentó gradualmente y fue a las 72 h cuando alcanzó el valor de mayor inactividad.

Como se puede apreciar en la figura 13, el grupo SSACC fue el único que presentó una tendencia al incremento en cada uno de los registros posteriores a la primera cirugía, los valores de mayor tiempo de inactividad que resultaron significativos ocurrieron a las 48 y 72 h después de la primera cirugía, estos valores correspondieron al 22.70 y 24.10% (* $p < 0.001$; Dunn; $n=56-71$).

El análisis estadístico entre los tiempos de inactividad de los grupos sham y SSACC no generó diferencias significativas.

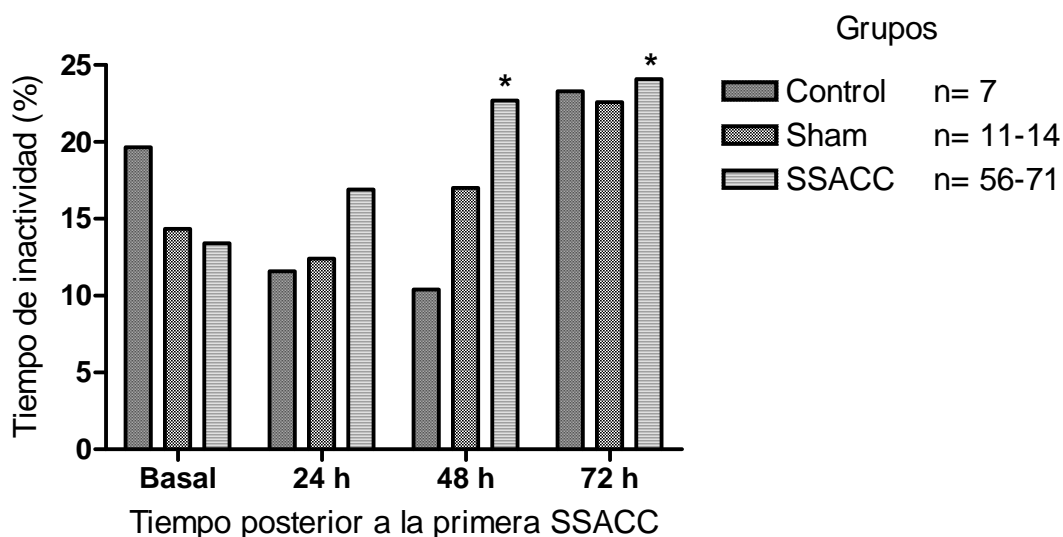


Figura 13. La gráfica muestra los porcentajes del periodo de inactividad registrados para cada grupo experimental a las 24, 48 y 72 h. Las abscisas representan el tiempo después de la primera cirugía y las ordenadas el tiempo de flotación o inactividad expresada en porcentaje. * $p < 0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn).

Segunda Cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía

i. Latencia. Tiempo empleado para realizar la prueba

La comparación entre grupos que se realizó previo a la segunda cirugía (basal), indicó que los registros del tiempo de llegada de estos grupos a la plataforma correspondieron a valores similares ya que no se encontró significancia estadística ($p=0.261$ N.S.), por el contrario, los registros realizados a las 24, 48 y 72 h mostraron diferencias significativas en los tiempos de llegada a la plataforma ($*p=0.000$).

Durante la segunda parte del experimento, el tiempo basal de llegada de los tres grupos se ubico por debajo de los 5 seg (Fig. 14). Posterior a la segunda cirugía, la latencia de nado del grupo control y del grupo sham (manipulación arteria carótida derecha) conservaron sus valores basales sin embargo los ratones con segundo corte de la arteria carótida, pertenecientes al grupo SSACC aumentaron el tiempo de llegada a la plataforma, alcanzando el mayor incremento a las 72 h posteriores al corte, este valor correspondiente a 16.55 seg obtuvo significancia estadística ($*p < 0.01$; Dunn; $n=10-48$).

El tiempo de latencia basal de los grupos y SSACC fue similar ($p= 0.315$; N.S.); sin embargo, solo se obtuvo significancia estadística en los registros de 24, 48 y 72 h posteriores a la segunda cirugía ($*p=0.000$).

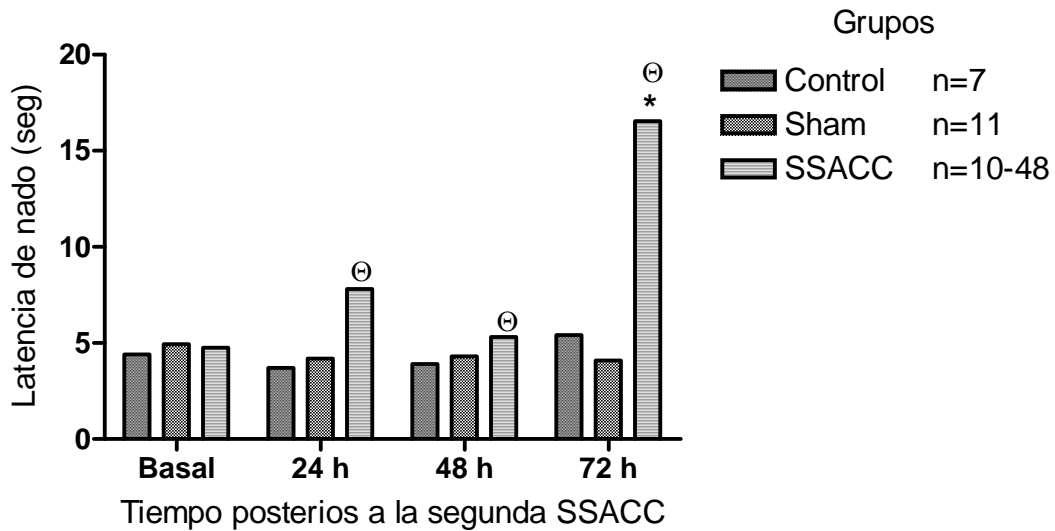


Figura 14. La gráfica muestra las medianas de los tiempos en que los grupos experimentales realizaron la tarea. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada la latencia expresada en segundos. * $p < 0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn). ⊖ diferente con respecto al grupo sham (* $p < 0.05$; Mann-Whitney)

ii. Distancia recorrida durante la prueba

La distancia promedio recorrida durante el registro previo a la segunda cirugía (basal) no generó diferencias entre los grupos control, sham y SSACC. Los grupos control y sham recorrieron una distancia similar, la cual permaneció dentro de los valores basales durante las 24, 48 y 72 h posteriores a la segunda cirugía (Fig. 15).

Por su parte, el grupo SSACC conservó valores cercanos a su basal a las 24 y 48 h después del corte de la arteria carótida derecha, en contraste, a las 72 h siguientes a la cirugía, el grupo obtuvo una distancia de recorrido por encima de su basal.

En cuanto a la comparación entre los grupos sham y SSACC se observó que la distancia generada por el grupo SSACC fue mayor a la del grupo sham en todos los registros posteriores a la cirugía, esta diferencia fue significativa (* $p = 0.000$).

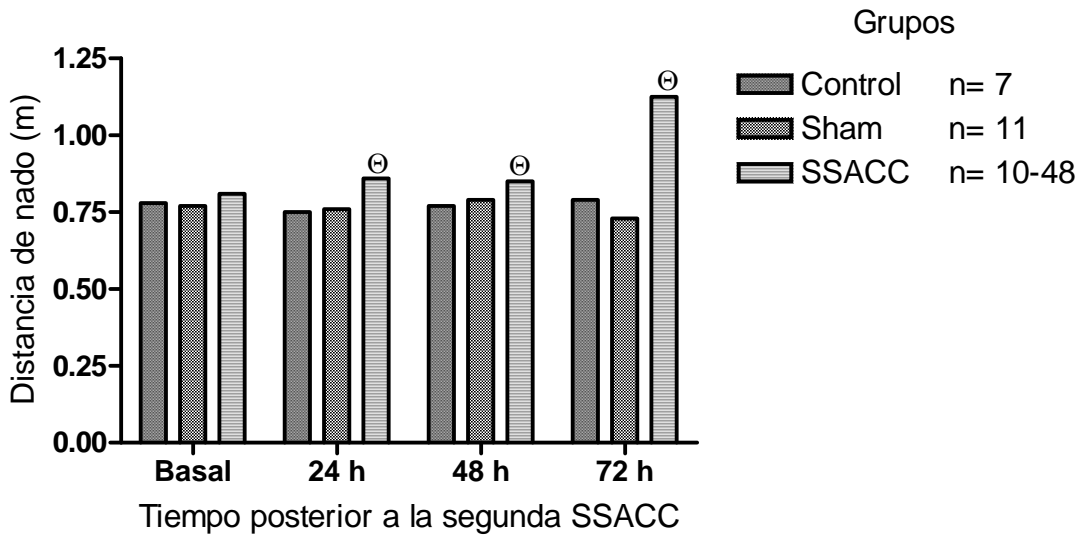


Figura 15. La gráfica muestra las medianas de la distancia recorrida durante la prueba de nado (m), obtenida a las 24, 48 y 72 h después de la segunda cirugía en los tres grupos experimentales. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada la distancia recorrida expresada en metros. * $p < 0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn). Θ diferente con respecto al grupo sham (* $p < 0.05$; Mann-Whitney).

iii. Velocidad empleada en la prueba

Las diferencias entre la velocidad de nado presentadas por los tres grupos ocurrieron a partir de las 24 h después de la segunda cirugía y continuó en los registros posteriores de 48 y 72 h.

Por otro lado, los valores de velocidad que los animales del grupo control registraron después de la cirugía, se ubicaron por arriba de su basal. De manera similar, el grupo sham generó ligeros incrementos en su velocidad que se mantuvieron cercanos al valor registrado previo a la cirugía (basal).

El grupo SSACC por su parte, después del corte de la arteria carótida derecha, redujo su velocidad en los tres registros (24, 48 y 72 h), el valor más bajo fue de 0.08 m/s,

se presentó a las 72 h y obtuvo significancia estadística (* $p < 0.001$; Dunn; $n = 10-48$; Fig.16).

La comparación entre la velocidad de los grupos sham y SSACC presentó diferencias significativas durante las 24, 48 y 72 h posteriores a la cirugía (* $p = 0.000$), de ambos, el grupo SSACC realizó la tarea con una velocidad muy baja.

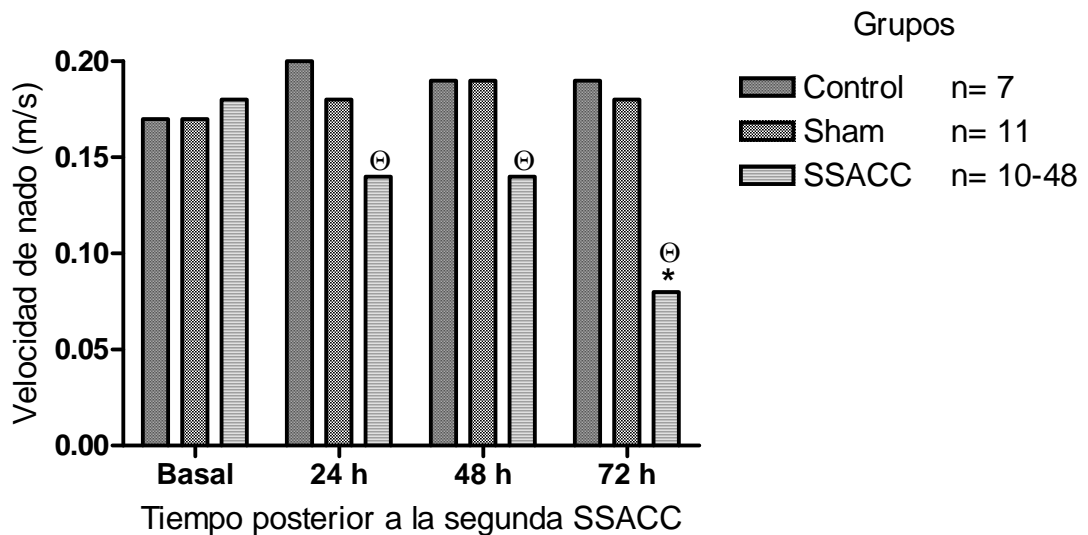


Figura 16. La gráfica muestra la mediana de la velocidad generada por los tres grupos experimentales a las 24, 48 y 72 h después de la segunda cirugía. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada la velocidad recorrida expresada en m/s. * $p < 0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn). \ominus diferente con respecto al grupo sham (* $p < 0.05$; Mann-Whitney).

iv. Porcentaje de flotación. Tiempo de inactividad dentro del agua

Los grupos experimentales registraron periodos de inactividad dentro del agua estadísticamente diferentes a los registrados durante la medición basal (0.009). Los registros posteriores a la segunda cirugía también alcanzaron significancia estadística (* $p = 0.000$; Fig.17).

A las 24 h después de la segunda cirugía los tres grupos mantuvieron un tiempo de inactividad menor al generado en su registro basal. En las siguientes 48 y 72 h los ratones de cada grupo permanecieron sin realizar movimientos por un lapso mayor de tiempo, éste fue incrementando gradualmente durante los registros hasta colocarse a las 72 h por encima del porcentaje basal, el grupo SSACC realizó el tiempo más prolongado de inactividad.

Los datos del tiempo de inactividad obtenidos de los grupos sham y SSACC, indicaron que el grupo al que se le practicó el corte de la segunda carótida (SSACC) permaneció durante más tiempo sin realizar movimientos dentro del agua a las 24, 48 y 72 h post cirugía, en comparación del grupo sham, estos resultados presentaron diferencias estadísticas (*p=0.000).

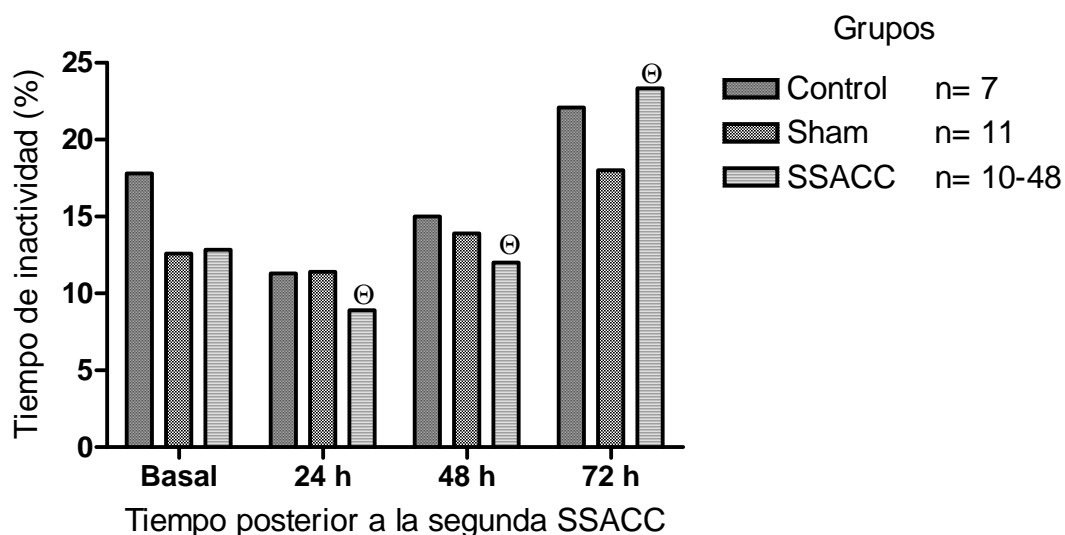


Figura 17. La gráfica muestra las medianas del periodo de inactividad que realizaron los grupos experimentales dentro del agua durante las 24, 48 y 72 h. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada el tiempo de flotación expresada en porcentaje. ⊖ diferente con respecto al grupo sham (*p< 0.05; Mann-Whitney).

4.1.3 Patrón Conductual

Considerando que este trabajo es la primera aproximación a la conducta de nado de los ratones con isquemia cerebral aguda inducida por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes, decidimos realizar la videograbación de cada una de las sesiones experimentales de nuestros animales con el objeto de identificar y caracterizar el patrón conductual de nado. El análisis cualitativo de la conducta de nado, así como la revisión de la literatura publicada con respecto al desarrollo y manifestación de esta conducta en varias especies de roedores, nos permitió identificar siete parámetros muy consistentes que nos permitieron caracterizar el patrón de la conducta de nado. Dichos parámetros fueron: ángulo de nado, que se refiere a la línea imaginaria que se dibuja de la base de la cola hasta el cruce de la nariz con respecto a la superficie del agua (Fig. 18; horizontal o vertical), nado en línea recta o en zig-zag, tocó las paredes de la alberca durante la realización de la actividad, llegó a la plataforma y sin subirse regresó al punto de origen y nado con flexión de extremidades anteriores. En todos los casos los valores se expresaron en porcentaje.

Primera cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda.

Grupo Control

Todos los ratones de este grupo presentaron un ángulo de nado horizontal (100%) durante el registro basal. El 71% de los ratones inició con un nado recto directo a la plataforma. El mismo porcentaje (71%) tocó las paredes de la alberca, mientras que 42% de los animales tocaron o llegaron a la plataforma sin subirla, regresando hacia el otro extremo de la alberca. Solo el 28% de la muestra usó el tren anterior durante su nado, un porcentaje similar (27%) realizó la conducta mediante un nado en zig-zag (Fig.19).



Fig. 18. Ángulos de nado presentados por los ratones durante la conducta de nado. En condiciones basales, los ratones que adquirieron la conducta de nado, presentaron un ángulo de nado horizontal con respecto a la superficie del agua, sin embargo, en los ratones con daño inducido por la SSACC, éste ángulo se modificó paulatinamente hasta alcanzar una inclinación tendiente a la vertical.

A las 24 h después de la cirugía, todos los animales de este grupo control nadaron de forma recta y con un ángulo horizontal ($n=7$). El porcentaje en que los roedores tocaron las paredes de la alberca (71%, $n=5$), la frecuencia con la que llegaron a la plataforma y regresaron (42%; $n=3$) permaneció con los mismos valores de su basal, al igual que el número de ratones que movieron el tren anterior durante el nado (28%; $n=2$). En la observación realizada a las 48 h, la presencia del ángulo horizontal y el nado recto permanecieron (100%; $n=7$), pero la frecuencia de tocar las paredes de la alberca y de tocar y llegar a la plataforma sin subirla, disminuyó a 57% ($n=4$) y 28% ($n=2$) respectivamente. A partir de este momento los animales dejaron de utilizar el tren anterior durante la ejecución de la prueba. Finalmente a las 72 h todos los ratones de este grupo control realizaron un nado recto con un ángulo horizontal ($n=7$). La conducta que nuevamente disminuyó su frecuencia fue tocar las paredes de la alberca (33%; $n=2$) mientras que la conducta de tocar la plataforma y regresar solo la presentó un animal del grupo (1%).

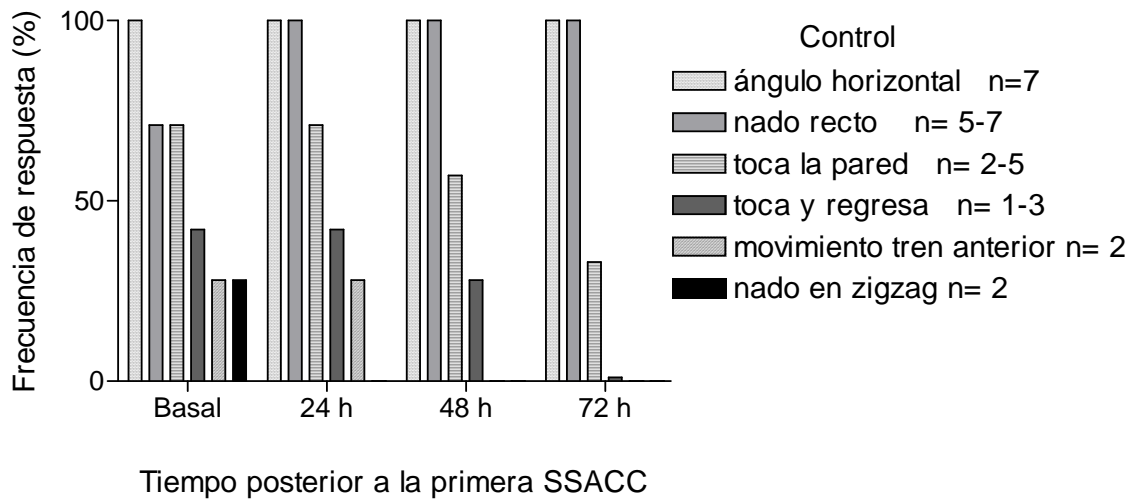


Figura 19. Patrón conductual del grupo control durante la prueba de nado. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía y las ordenadas el porcentaje de incidencia de las conductas evaluadas. Nótese como los animales adquieren un nado recto a las 24 h mientras que el resto de las conductas disminuyen su frecuencia.

Grupo Sham

En el registro basal de la conducta de nado de los animales del grupo sham se observó que el 69% de la muestra nadó en ángulo horizontal (n=9) y un 31% nadó con un ángulo vertical (n=4). La dirección del nado que predominó fue el recto (84%; n=11) en tanto que el 16% restante lo hizo en zig-zag (n=2). El 66% del grupo tocó las paredes de la alberca (n=8), mientras que el 33% tocó o llegó a la plataforma sin subirla, este mismo porcentaje se obtuvo en la frecuencia del movimiento del tren anterior durante el tiempo de nado (n=4; Fig.20). A las 24 h después de la manipulación de la arteria carótida izquierda, se perdió la verticalidad de la conducta de nado prevaleciendo el ángulo horizontal (100%; n=11), el nado recto varió poco (83% n=9) y el nado en zig-zag conservó su valor basal (16%; n=2) al igual que la frecuencia en que los animales tocaban la plataforma y regresaban (33%; n=4). Se registró una disminución en la conducta de tocar las paredes de la alberca (50%; n=5) y el movimiento del tren anterior (16%; n=2).

Durante las observaciones realizadas a las 48 h, el porcentaje de nado horizontal disminuyó a (81%; n=9), el porcentaje restante lo obtuvo el ángulo vertical que apareció nuevamente en dos de los ratones (19%). El nado recto lo presentó el 81% de la muestra (n=9) y el 18% nadó en zig-zag (n=2). Otra ligera disminución ocurrió en la incidencia de tocar las paredes (45%; n=6) y tocar plataforma y regresar (18%; n=2). El incremento más sobresaliente se generó en la conducta de movimiento del tren anterior que alcanzó un porcentaje del 72% muy por encima de su basal (n=8). La última medición realizada a las 72 h se caracterizó por la conducta de nado recto por todo el grupo (100%; n=11) a pesar de que el 28% lo realizó con un ángulo de nado vertical (n=3), este incremento se reflejó en el porcentaje de animales que desarrollaron la conducta con un ángulo horizontal ya que disminuyó a 72% (n=8). Otra característica importante es que desaparecieron las conductas de nado en zig-zag y de tocar la plataforma y regresar. No obstante prevaleció el tocar las paredes (54%; n=7) y el movimiento del tren anterior (n=5), aunque éste disminuyó a 45%.

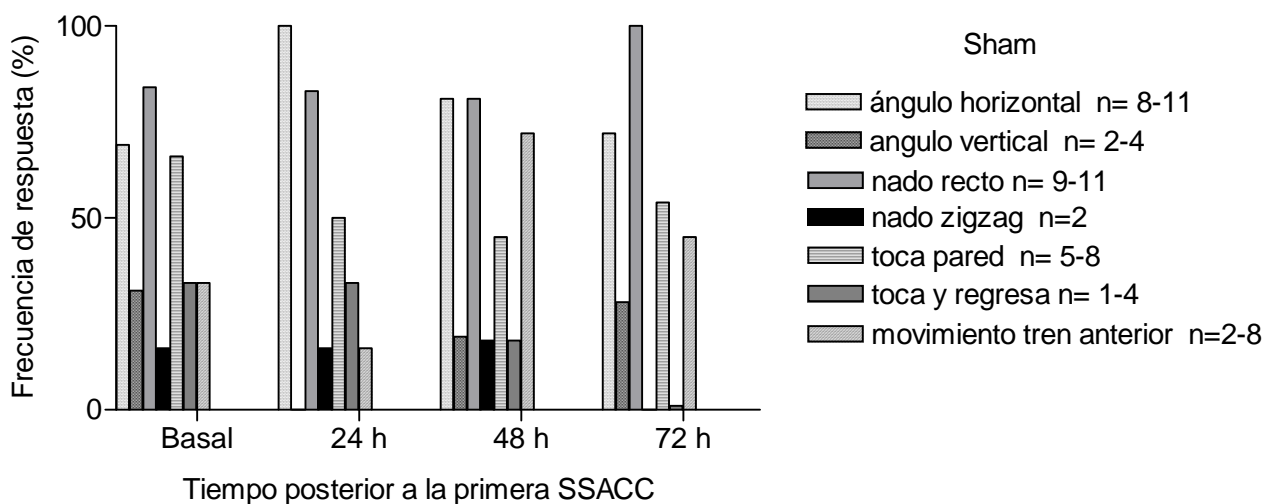


Figura 20. Patrón conductual del grupo sham después de la primera cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía y las ordenadas el porcentaje de incidencia de las conductas evaluadas. Nótese que a pesar de disminuir el ángulo horizontal a las 24 h, los ratones realizaron la prueba en nado recto en su último registro.

Grupo SSACC

El registro obtenido previo a la primera cirugía (basal) mostró que los animales de este grupo realizaron en su mayoría un nado recto (75%), con un ángulo horizontal (88%) mientras que un 12% presentó un ángulo de nado vertical, y 25% de ellos efectuaron la tarea con un nado en zig-zag. El 64% de los ratones tocó las paredes de la alberca y el 45% tocó la plataforma y regresó. Solo un 22% presentó movimiento del tren anterior mientras nadaba (ver fig 21). Transcurridos 24 h después del corte de la carótida derecha, el número de animales que realizó un nado en ángulo horizontal aumentó (91%), disminuyendo así la ejecución en ángulo vertical. La presencia de nado recto también disminuyó (52%) aumentando el nado en zig-zag (43%). Por otro lado, la conducta de tocar las paredes de la alberca fue más frecuente, con un valor de 76% sobrepasando así su basal. Otra variable que se comportó de la misma forma fue el movimiento del tren anterior, el cual se efectuó en el 85% de los ratones, casi el doble de su basal. Con lo que respecta a la conducta de tocar la plataforma y regresar, fue realizada en el 40% de los animales, indicando una ligera disminución con respecto a su basal. Para el registro de las 48 h, pese a que el número de animales que ejecutaron el nado recto se incrementó al 74%, el ángulo de nado horizontal (75%) fue menor al presentado durante las 24 h, siendo el ángulo vertical más frecuente (25%). Las conductas que disminuyeron su incidencia fueron el nado en zig-zag (18%), el tocar las paredes de la alberca (50%) así como tocar la plataforma y regresar (16%). El porcentaje de la muestra que realizó el movimiento de trenes anteriores fue el mismo que en la medición de las 24 h (42%). En el registro de las 72 h, el nado recto y en ángulo horizontal aumentaron su presencia al 85 y 82% respectivamente, el ángulo de nado vertical fue menor (18%) y no se observó el nado en zig-zag. La frecuencia en tocar las paredes volvió a disminuir (33%) mientras que el tocar

la plataforma y regresar aumentó su presencia (21%) al igual que el movimiento de trenes anteriores (50%), siendo el porcentaje más alto que se registro durante las cuatro mediciones.

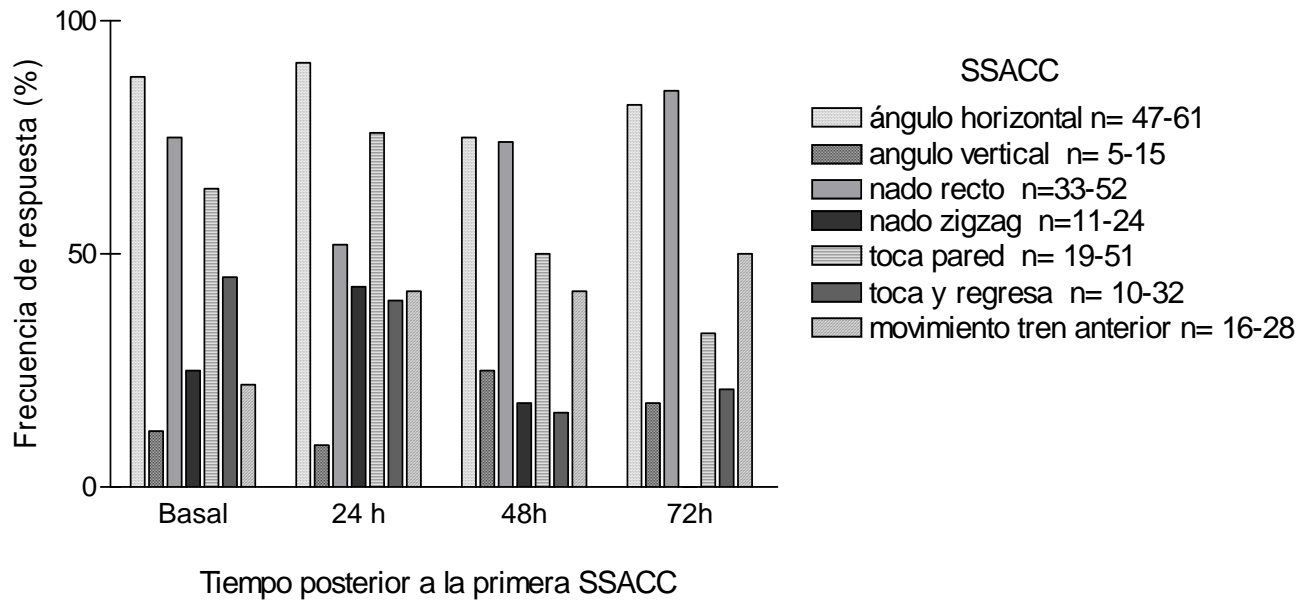


Fig 21. Patrón conductual del grupo SSACC después de la primera cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía y las ordenadas el porcentaje de incidencia de las conductas evaluadas. Nótese que al término de las 72 h este grupo mostró una recuperación en su patrón conductual.

Segunda Cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía.

Grupo Control

Durante el registro de la conducta basal, como a lo largo de las 72 h en que duró el experimento, todos los animales de este grupo realizaron un nado recto con un ángulo horizontal (100%). Sólo a las 24 h, el 10% de esta muestra tocó la plataforma y regresó, y durante el registro final del experimento correspondiente a las 72 h, 30% tocó las paredes de la alberca y 33% efectuó movimientos con el tren anterior durante su nado (Fig.22).

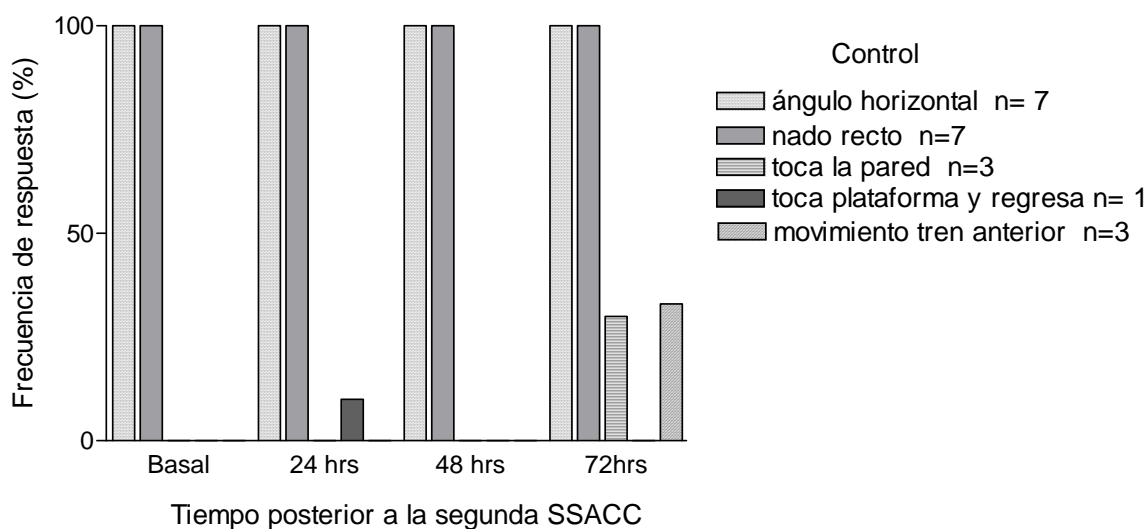


Figura 22. Conducta de nado del grupo control después la segunda cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía y las ordenadas el porcentaje de incidencia de las conductas evaluadas. Nótese que el grupo mantuvo su ángulo horizontal y nado recto hasta el término del experimento.

Grupo Sham

El desempeño de la conducta de los ratones de este grupo en condiciones basales se desarrolló en nado recto en el 75% de los ratones, con una posición de ángulo horizontal en el 100 % de los animales. El 25% de la muestra se desplazó con un nado en zigzag. Se presentó también la conducta de tocar las paredes de la alberca en un 58% y el 33% de los ratones tocó la plataforma y regresó al punto inicial sin subir a la plataforma. 24 h después de la manipulación de la arteria carótida derecha la conducta de nado observada fue recta en el 90% de los casos. Todos los animales conservaron el ángulo de nado horizontal observado durante el registro basal (100%). Por otro lado, el nado en zigzag disminuyó a 10%, al igual que la frecuencia de tocar las paredes de la alberca. La conducta de tocar la plataforma y regresar se redujo al 20%. En el registro conductual realizado a las 48 h el 100% de los ratones tuvieron un nado recto; sin embargo, el 10% de los animales pasó del ángulo horizontal al vertical.

Finalmente a las 72 h, los animales conservaron los porcentajes de nado recto y en ángulo horizontal y vertical (Fig.23). Mientras que el tocar las paredes y tocar la plataforma y regresar se realizaron sólo en un 10%, porcentaje menor que el presentado a las 48 h. Cabe señalar que a excepción del nado recto, ninguno de los valores de las conductas registradas sobrepasó el porcentaje obtenido en condiciones basales.

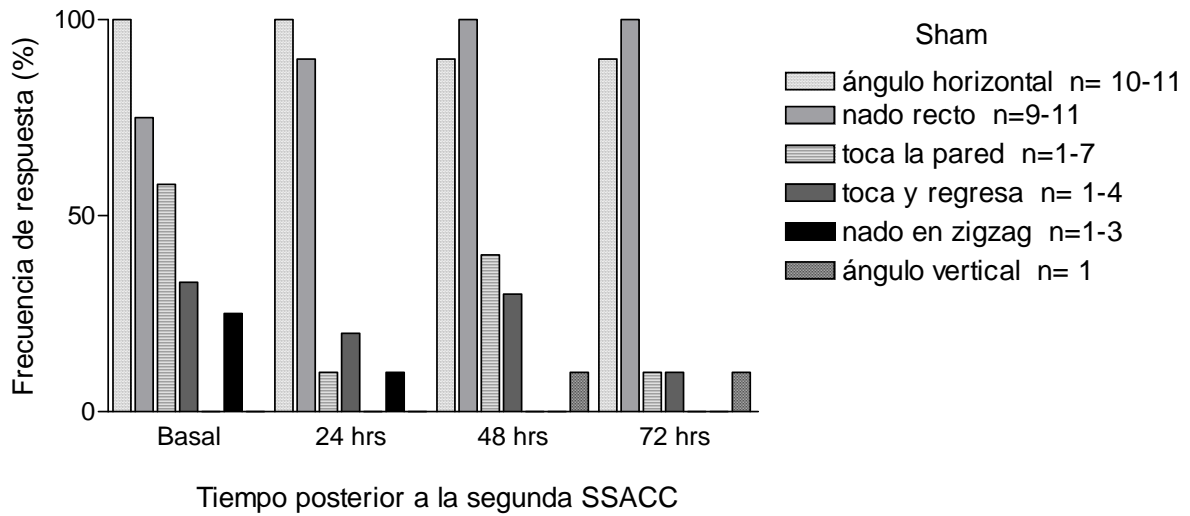


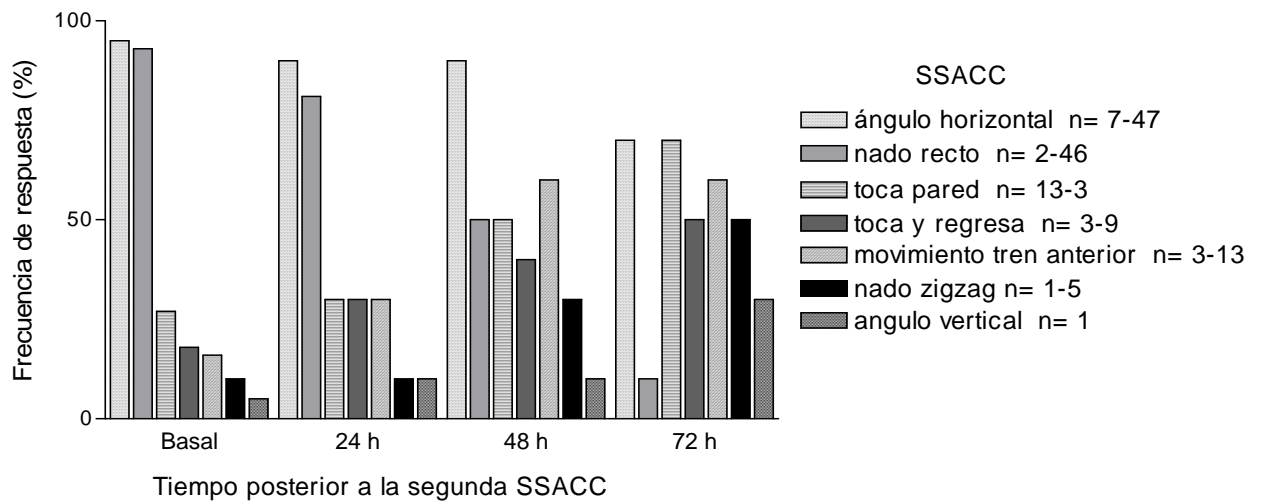
Figura 23. Patrón conductual del grupo sham después de la segunda cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía y las ordenadas el porcentaje de incidencia de las conductas evaluadas. Nótese que durante las pruebas el nado recto mejoró, mientras que el resto de las conductas redujeron su incidencia.

Grupo SSACC

Durante el registro de la conducta basal de los animales sometidos a segunda cirugía, se observó que el 93% efectuó un nado en línea recta, el 95 % de ellos nadaron sobre la superficie del agua generando un ángulo horizontal. La frecuencia de nado en zigzag fue del 10 % en tanto que el 5 % de los sujetos experimentales mostraron una conducta de nado en ángulo vertical. La frecuencia con que este grupo de animales tocó las paredes fue del 27%, y sólo el 18% tocó la plataforma y regresó hacia el punto de partida. Durante la ejecución de la conducta de nado el 16% de los animales movieron el tren anterior (Fig.24). El registro realizado 24 h después del corte de la segunda carótida, presentó una reducción en el número de ratones que efectuaron un nado en línea recta (81%). De igual forma el ángulo horizontal disminuyó a 90%. Por otro lado, la frecuencia con que este grupo (SSACC) tocó las paredes de la alberca, tocó la plataforma y regresó

al punto de inicio y realizó movimiento del tren anterior, se vio incrementada. Estas conductas se ubicaron en un 30%. El nado en zigzag permaneció en 10%, este mismo porcentaje se presentó en la conducta de ángulo vertical al aumentar su porcentaje basal. En las 48 h después del corte de la carótida derecha, el número de ratones que realizó un nado recto se redujo a la mitad (50%) sin embargo el ángulo de nado horizontal se mantuvo en 90%. En contraste, la frecuencia de nado en zigzag por parte de los animales se incrementó a 30% mientras que el nado en ángulo vertical permaneció con el porcentaje obtenido en el registro de las 24h. El efecto de la segunda cirugía en el patrón conductual fue más evidente a las 72 h principalmente en el nado recto ya que sólo 10% de los ratones lo exhibieron; en consecuencia el nado en zigzag aumentó al 50%. El ángulo de nado también se vio afectado, 70% de los animales lo realizaron de forma horizontal y el 30% restante lo hizo en ángulo vertical. Los parámetros conductuales que incrementaron su frecuencia a las 72 h fueron el tocar la pared (70%) y el tocar la plataforma y regresar (50%). El movimiento del tren anterior no presentó modificaciones con respecto al registro de las 48 h, permaneció con un porcentaje de 60%.

Figura 24. Patrón conductual de los ratones isquémicos después la segunda cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía y las ordenadas el porcentaje de incidencia de las conductas evaluadas. Nótese que los ratones van mostrando un patrón conductual más alterado en comparación con su basal, la perdida más evidente la representa el nado recto que a las 72hrs es escaso.



4.2 *Experimento 2*: Efecto del dexrazoxano sobre las alteraciones conductuales inducidas por la SSACC en la conducta de nado.

4.2.1 Mortalidad

Primera cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda.

En este segundo experimento se presentó una muerte en los animales del grupo control (1/12) correspondiente al 8.33 %; y 5 más (5/27) en el grupo sham (cirugía sin ligadura), lo que equivale a 18.5%. Lo anterior representa el 85% de sobrevida a las 96 h post-cirugía. En el grupo de los animales SSACC la sobrevida fue equivalente al 68% (34/108). No se presentaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevida de los tres grupos (Fig. 25).

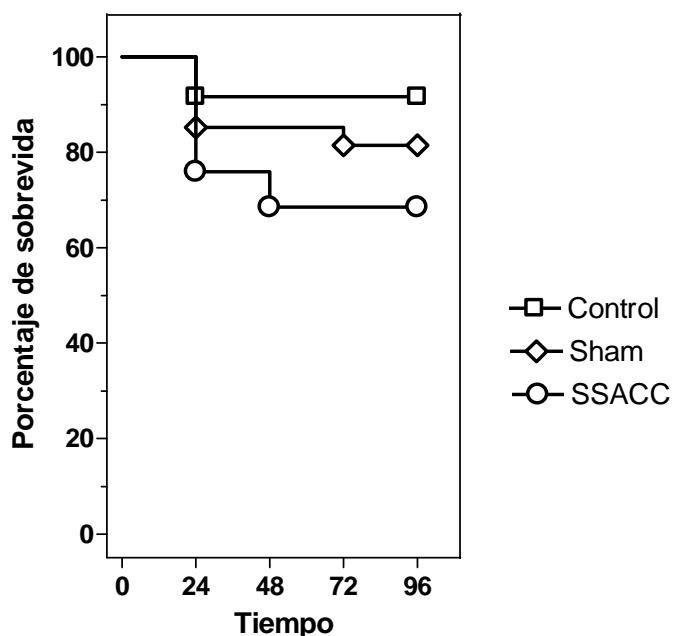


Figura 25. Curvas de sobrevida en ratones de grupo control, sham y SSACC durante la primera cirugía. Las abscisas representan el tiempo después de la cirugía, las ordenadas el porcentaje de sobrevida. Las curvas fueron calculadas por el método Kaplan-Meier.

Segunda Cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía.

Después de la segunda cirugía no se observaron muertes en el grupo control (10/10). En el grupo sham se presentaron dos muertes (2/20) la primera a las 48 h y la segunda a las 72 h (90%). El 23.14% de los animales (25/69) del grupo SSACC murió durante los primeros 15 min después del procedimiento quirúrgico, posteriormente las muertes fueron incrementándose hasta alcanzar un 37.68% de sobrevivida a las 24 h (36/69), 24.64% a las 48 (9/69) y 17.39 % (12/69) a las 96 h. Las curvas fueron calculadas con el método Kaplan-Meier y comparadas usando la prueba de rangos logarítmicos. Se observaron diferencias significativas entre el grupo SSACC y los grupos control y sham (Fig. 26).

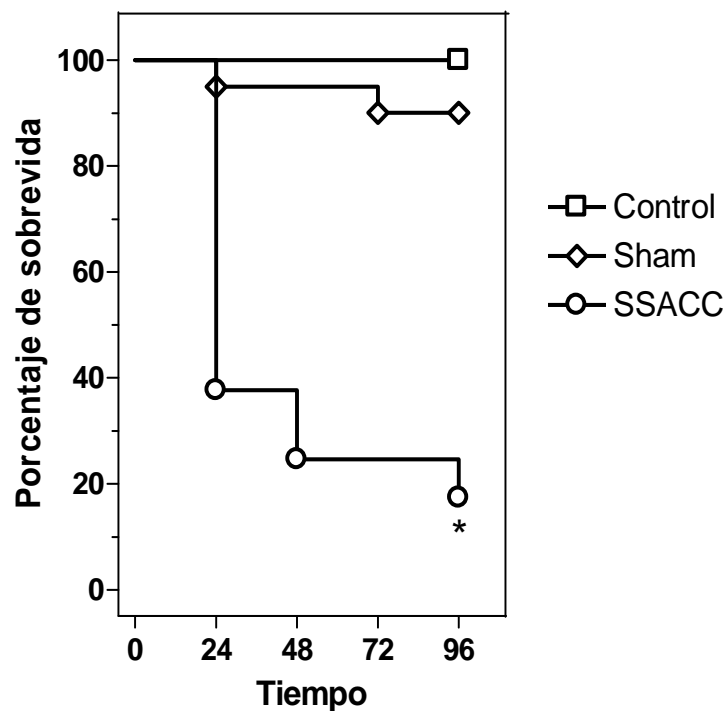


Figura 26. Curvas de sobrevivida después de la segunda cirugía de los grupos control, sham y SSACC. (* $p < 0.001$, prueba de rangos logarítmicos).

Para este segundo experimento, se aumentó un día más el registro de medición de la conducta de nado con el fin de identificar las posibles modificaciones inducidas por la SSACC a las 96 horas post-cirugía tanto en la ejecución de la conducta de nado correspondiente a la latencia, la distancia, la velocidad y el porcentaje de flotación; y en las conductas que los ratones presentan durante la prueba identificadas como el patrón conductual.

4.2.2 Conducta de nado.

Primera cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda.

i. Latencia. Tiempo empleado para realizar la prueba

La comparación de los tiempos en que los ratones de los tres grupos llegaron a la plataforma, mostró que sólo en el registro previo a la cirugía (basal) y a las 24 h posteriores a la misma, los grupos presentaron tiempos de latencia significativamente diferentes (* $p=0.040$ y * $p=0.028$ respectivamente), sin embargo a partir de las 48 h y hasta las 96 h, realizaron la prueba con tiempos similares (Fig.27).

El tiempo de llegada a la plataforma del grupo control en la prueba basal y 24 h después de la primera cirugía se realizó en el mismo tiempo, a las 48 h los ratones invirtieron menor tiempo, éste se conservó hasta las 72 h, ya que en la última prueba (96h) disminuyó significativamente a 4 seg en comparación con su latencia basal (* $p<0.05$; Dunn; $n=11-12$).

Por su parte el grupo sham ($n=22-27$) presentó el mismo tiempo de llegada a la plataforma en el registro basal y 24 h después de la primera cirugía pero en los siguientes

registros la latencia disminuyó, no obstante estos nuevos tiempos permanecieron cercanos a su basal.

En contraste, el grupo SSACC 24 h después del corte de la primera carótida, llegó a la plataforma en 6.75 seg, tiempo significativamente mayor al registrado durante la basal (* $p < 0.001$; Dunn; $n = 74-108$) esta latencia fue la más alta que el grupo registró. En las 48, 72 y 96 h posteriores los tiempos de latencia regresaron a valores similares a su basal.

Los ratones del grupo Sham y SSACC obtuvieron tiempos de latencia significativamente diferentes sólo a las 24 h después de la primera cirugía (* $p = 0.009$).

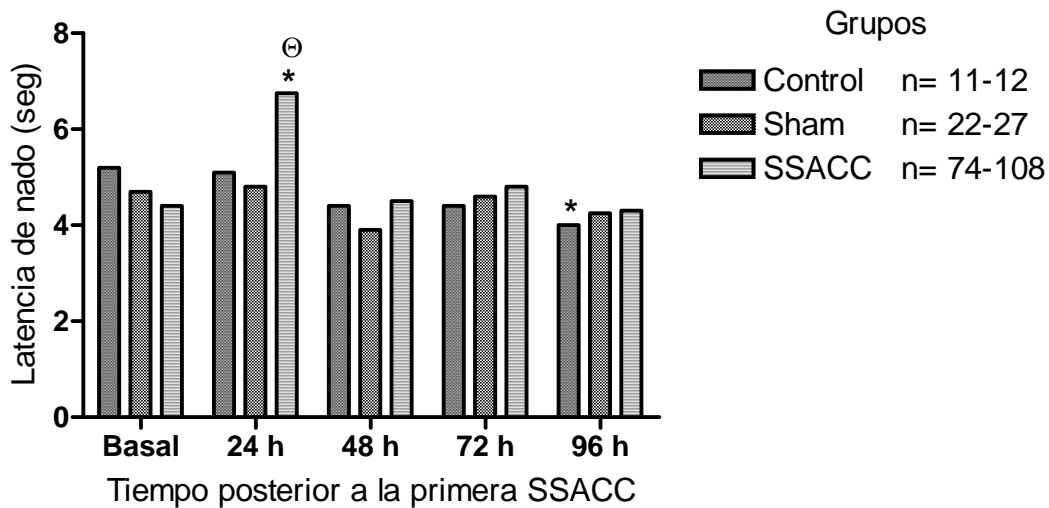


Figura 27. La gráfica muestra las medianas de los tiempos de latencia durante el registro basal y 24, 48, 72 y 96 h después de la cirugía. La abscisa representa el tiempo después de la primera cirugía y la ordenada la latencia expresada en segundos. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguida de Dunn). Θ diferente con respecto al grupo sham ($p < 0.05$; Mann-Whitney).

ii. Distancia recorrida durante la prueba

La distancia recorrida en la medición basal de los tres grupos (control, sham y SSACC) fue el único registro que alcanzó significancia estadística (* $p = 0.004$; Fig.28) ya

que después de la primera cirugía los ratones recorrieron una distancia similar para llegar a la plataforma.

A las 24 h el grupo control recorrió una distancia mayor a la registrada en la basal, a partir de las 48, 72 y 96 h los ratones de este grupo realizaron la tarea en una menor distancia.

Por su parte, el grupo sham después de la manipulación de la carótida, mantuvo a lo largo de todas las pruebas una distancia recorrida similar a la medición basal.

En contraste, el grupo SSACC durante las 24, 48 y 72 h realizó la prueba con una distancia recorrida significativamente mayor a su basal ($*p < 0.001$; Dunn; $n = 74-108$), cabe señalar que en los registros de las 48 y 72 h el grupo conservó la misma distancia, los valores obtenidos correspondieron a 0.83 y 0.78 m. En la última prueba a las 96 h, la distancia recorrida disminuyó a un valor cercano a la basal.

Tanto los ratones del grupo sham como los del grupo SSACC tuvieron un desempeño parecido en el registro basal así como en los registros posteriores a la primera cirugía.

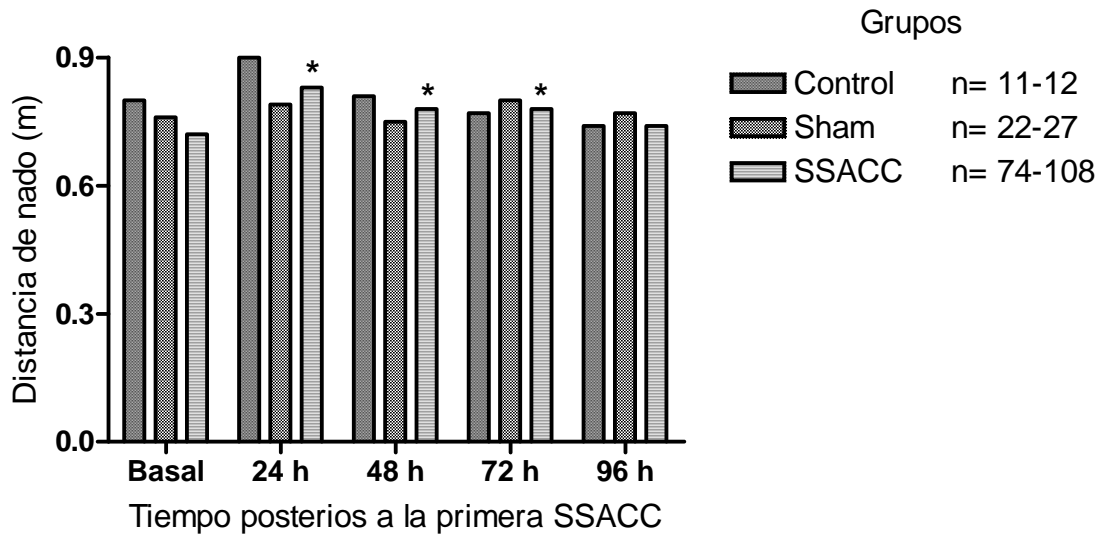


Figura 28. La gráfica muestra las medianas de la distancia recorrida durante la prueba de nado (m), obtenida en el registro basal y a las 24, 48, 72 y 96 h después de la primera cirugía en los tres grupos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn). Θ diferente con respecto al grupo sham (* $p < 0.05$; Mann-Whitney)

iii. Velocidad empleada en la prueba

Los valores de velocidad que mostraron los ratones de los tres grupos, fueron diferentes únicamente a las 24 h (* $p = 0.001$), 48h (* $p = 0.046$) y 96 h (* $p = 0.006$) posteriores a la primera cirugía.

El valor de velocidad que los grupos control y sham presentaron en el registro basal y 24 h después de la primera cirugía, fue similar en ambos grupos y en los registros posteriores a la cirugía.

Sin embargo el grupo SSACC después del corte de la arteria carótida izquierda (24 h) realizó la prueba a una velocidad de 0.14 m/s la cual fue significativamente menor al valor basal (* $p < 0.05$; Dunn; $n = 74-108$). A las 48 h el grupo realizó la tarea a una velocidad

mayor, que se colocó por arriba de su basal, ésta se conservó en la prueba de las 72 h. Finalmente la velocidad alcanzada a las 96 h regresó a su valor basal (Fig. 29)

La comparación de la velocidad adquirida entre los grupos sham y SSACC indicó que los valores más bajos representados por el grupo SSACC ocurrieron a las 24 y 96 h posteriores a la primera cirugía, estos valores obtuvieron una significancia estadística de $p=0.000$ y $p=0.040$ respectivamente.

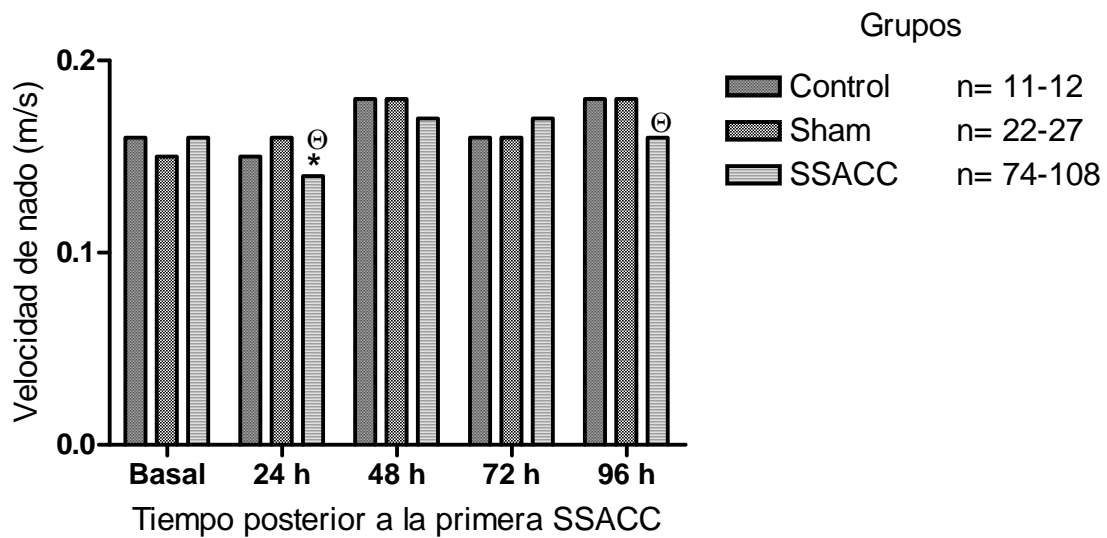


Figura 29. La gráfica muestra las medianas de la velocidad generada por los tres grupos experimentales a las 24, 48, 72 y 96 h después de la primera cirugía. La abscisa representa el tiempo después de la primera cirugía y la ordenada la velocidad recorrida expresada en m/s. * $p<0.05$ con respecto a su valor basal (Dunn). \ominus diferente con respecto al grupo sham ($p<0.05$; Mann-Whitney).

iv. Porcentaje de flotación Tiempo de inactividad dentro del agua

Durante el registro basal ninguno de los grupos registró diferencias significativas en su periodo de inactividad dentro del agua.

El grupo control permaneció por menos tiempo sin realizar movimientos dentro del agua durante las 24 y 48 h posteriores a la primera cirugía, de ambos sólo el último

registro presentó significancia estadística al obtener 11% de inactividad (* $p < 0.05$, Dunn; $n = 11-12$; fig 30) en comparación con su valor basal (20.80%). Durante las siguientes pruebas (72 y 96 h) la tendencia cambió, ya que los animales estuvieron mayor tiempo inactivos en el agua, dicho aumento fue gradual, ya que el valor más alto se observó a las 72 h posteriores a la primera cirugía.

Por su parte el grupo sham, 24 h después de la manipulación de carótida, disminuyó su tiempo de inactividad por debajo de la basal, pero en la siguiente prueba de las 48 h permaneció inactivo por un tiempo ligeramente mayor al valor inicial. Para las 72 y 96 h el tiempo de flotación volvió a disminuir hasta colocarse por debajo de los valores basales.

En cuanto a los ratones con corte de la carótida izquierda el menor tiempo de inactividad ocurrió 24 h después de la primera cirugía. Durante las 48 y 72 h el porcentaje incrementó, los valores fueron similares en ambos. Para el último registro de las 96 h la inactividad volvió a incrementarse y puntuó más alto que el registro basal, este nuevo valor correspondió al porcentaje más alto que el grupo produjo después de la primera cirugía.

La comparación de la inactividad entre los grupos sham y SSACC no mostró significancia estadística en la basal ni tampoco en los registros posteriores a la primera cirugía.

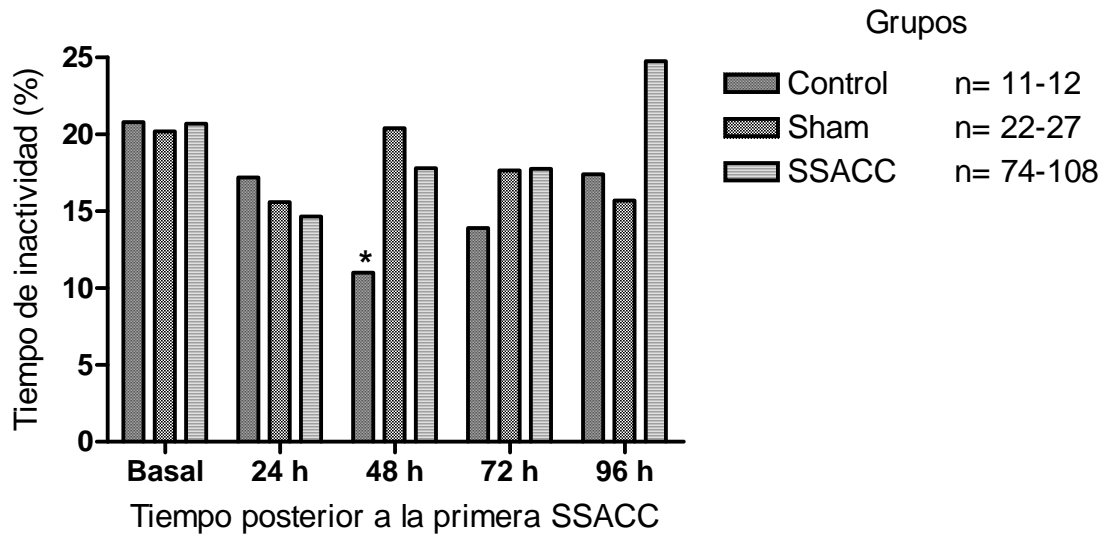


Figura 30. La gráfica muestra las medianas del periodo de inactividad que realizaron los grupos experimentales dentro del agua durante las 24, 48, 72 y 96 h. La abscisa representa el tiempo después de la primera cirugía y la ordenada el tiempo de flotación expresada en porcentaje. * $p < 0.05$ con respecto a su basal (Dunn).

Segunda cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía.

i. Latencia. Tiempo empleado para realizar la prueba

Después de la segunda cirugía los tiempos de llegada a la plataforma entre los tres grupos experimentales manifestaron diferencias significativas, a las 24 h fue de $*p=0.001$ y para los registros de 48, 72 y 96 h fue de $*p=0.000$ (Fig. 31).

El grupo control durante todos los registros posteriores a la segunda cirugía realizó la prueba con tiempos de latencia mayores a su basal. Los registros de las 48 y 72 h obtuvieron tiempos similares, mientras que el mayor tiempo de llegada a la plataforma se registró a las 96 h.

Por su parte, el incremento en los tiempos de llegada a la plataforma del grupo sham, se presentó durante las 24 y 48 h después de la segunda cirugía, de ambos, solo el tiempo de las 48 h correspondiente a 5.50 seg fue significativo respecto a su basal (* $p < 0.05$). En las 72 h siguientes los ratones llegaron a la plataforma en un menor tiempo, sin embargo a las 96 h volvió a extenderse el tiempo de latencia, el cual finalizó en 7.90 seg, este incremento además de ser el mayor tiempo que empleó el grupo para llegar a la plataforma, obtuvo diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.001$; Dunn; $n=20-18$).

Después de la segunda cirugía, el grupo SSACC con corte de la segunda arteria carótida generó tiempos de llegada a la plataforma significativamente superiores a su basal (* $p < .001$; Dunn; $n=69-12$). El tiempo de latencia más alto fue de 7.70 seg y se registró a las 48 h mientras que el valor más bajo ocurrió a las 72 h y correspondió a 6.50 seg. La latencia de llegada a la plataforma en las pruebas de 24 y 96 h fueron de 7.65 y 7.55seg respectivamente.

La comparación de los tiempos de latencia entre los grupos sham y SSACC reflejó un incremento significativo en el tiempo de llegada a la plataforma de los ratones del grupo SSACC a partir de las primeras 24 h después de la segunda cirugía, y durante las 48, 72 y 96 h en que duró el experimento. La significancia para todos los registros fue de * $p=0.000$.

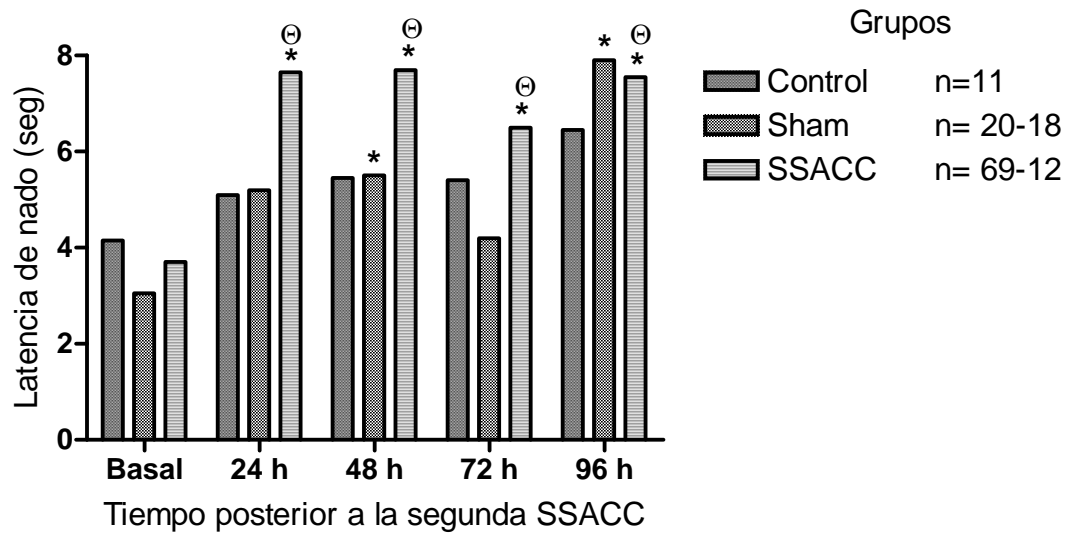


Figura 31. La gráfica muestra las medianas de los tiempos en que los grupos experimentales realizaron la tarea durante el registro basal y a las 24, 48, 72 y 96 h. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada la latencia expresada en segundos. * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis seguida de Dunn. Θ diferente con respecto al grupo sham (* $p < 0.05$; Mann-Whitney).

ii. Distancia recorrida durante la prueba

La distancia recorrida por los grupos control, sham y SSACC en el registro basal obtuvieron valores similares, sin embargo 24 h después de la segunda cirugía las diferencias entre los grupos fueron significativas (* $p = 0.001$). Estas diferencias continuaron durante las 48, 72 y 96 h post cirugía (* $p = 0.000$; Fig.32).

El grupo control incrementó gradualmente su distancia recorrida a las 24 y 48 h posteriores a la segunda cirugía. En las 72 h siguientes el grupo recorrió una menor distancia para llegar a la plataforma, sin embargo en la prueba de las 96 h los ratones nuevamente recorrieron una distancia significativamente mayor (0.91 m) con respecto a lo observado en la basal (* $p < 0.05$; Dunn; $n = 11$), éste valor correspondió al más alto.

De manera similar, el grupo sham incrementó gradualmente su distancia y la cuál fue estadísticamente significativa con respecto a su basal a las 48 h posteriores a la manipulación de la carótida derecha, cuando registró 0.74 m (*p<0.05; Dunn; n=20-18). Durante la prueba de las 72 h el grupo recorrió una menor distancia sin embargo ésta aumentó a 1.00m a las 96 h posteriores a la segunda cirugía y presentó significancia estadística al *p<0.001 (Dunn).

La distancia que el grupo SSACC recorrió para llegar a la plataforma fue significativamente mayor a lo observado en su basal, en todos los registros posteriores al corte de la segunda arteria carótida (*p<0.001; Dunn; n=69-12). El valor más alto correspondió a 1.26m y se presentó a las 48 h. Las distancias de las 24, 72 y 96 h fueron de 0.91, 0.96 y 1.06 m respectivamente.

Las diferencias significativas entre los grupos sham y SSACC se presentaron a las 24 (*p=0.004), 48,72 y 96 h posteriores a la segunda cirugía (*p=0.000).

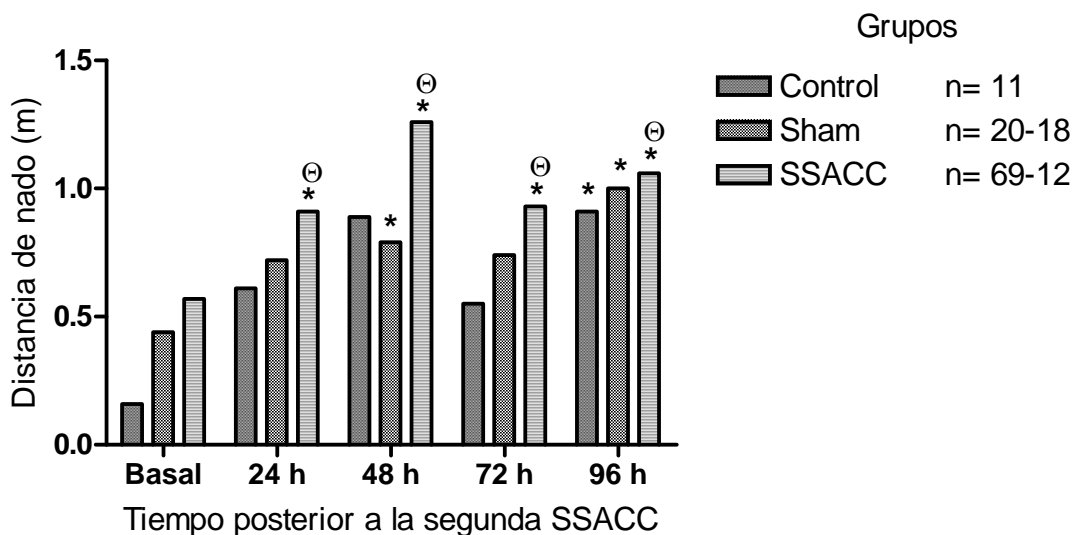


Figura 32. La gráfica muestra las medianas de la distancia recorrida durante la prueba de nado (m), obtenida en el registro basal y a las 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda

cirugía en los tres grupos experimentales. $*p < 0.05$ Kruskal-Wallis seguida de Dunn. Θ diferente con respecto al grupo sham ($p < 0.05$; Mann-Whitney).

iii. Velocidad empleada en la prueba

Se observaron diferencias significativas ($*p = 0.000$) en la velocidad que los ratones de los tres grupos emplearon para llegar a la plataforma, en los cuatro registros posteriores a la segunda cirugía.

La velocidad del grupo control aumentó durante las 24 y 48 h después de la segunda cirugía, en esta última se presentó el valor más alto de este grupo. En contraste, para la prueba de las 72 h una disminución de la velocidad con la que los ratones realizaron la prueba (0.09 m/s), obtuvo diferencia estadística de $*p < 0.05$. Finalmente a las 96 h la velocidad que adquirieron los ratones fue semejante a la que realizaron en las 24 h posteriores a la segunda cirugía.

Por su parte el grupo sham realizó la tarea a una velocidad similar en todos los registros después de la manipulación de la carótida a excepción de las 72 h cuando realizó prueba a una velocidad mayor que la observada en su basal.

El grupo SSACC mantuvo la misma velocidad en las 24, 72 y 96 h después del segundo corte de la arteria carótida, la cual se colocó por debajo de su valor inicial (basal). Como se puede observar en la figura 33 a las 48 h este grupo presentó la velocidad más alta.

Los valores más bajos de velocidad los presentó el grupo SSACC durante las 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda cirugía, estos valores fueron significativos al compararlos contra el grupo sham ($*p = 0.000$).

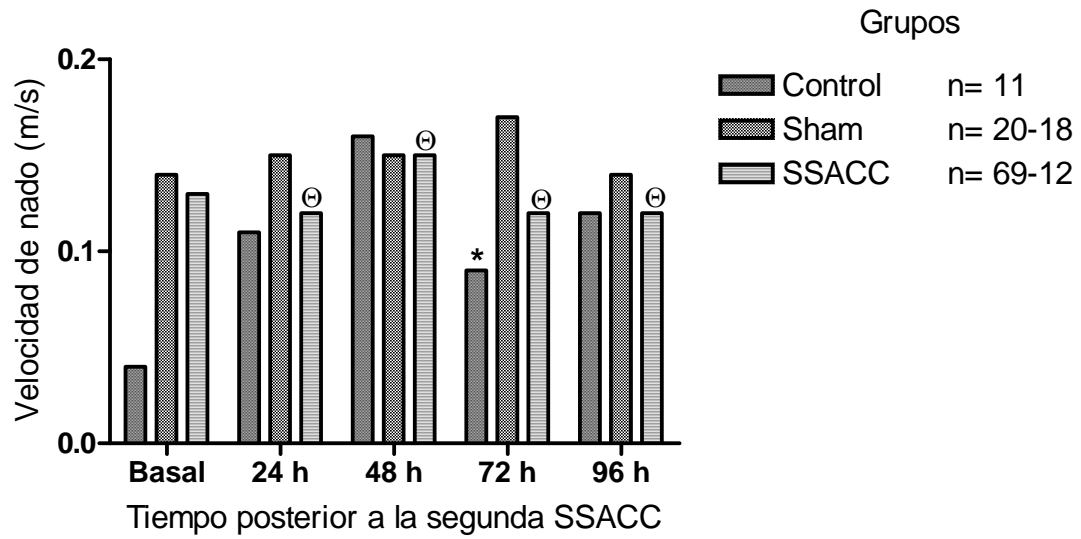


Figura 33. La gráfica muestra las medianas de la velocidad generada por los tres grupos experimentales a las 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda cirugía. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada la velocidad recorrida expresada en m/s. * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis seguida de Dunn con respecto a su valor basal. Θ diferente con respecto al grupo sham ($p < 0.05$; t Mann-Whitney).

iv. Porcentaje de Flotación Tiempo de inactividad dentro del agua

El tiempo de inactividad dentro del agua mostrado por los tres grupos presentó diferencias estadísticamente significativas durante su registro basal (* $p=0.024$) y a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores a la segunda cirugía (* $p=0.000$).

Previo a la segunda cirugía, el tiempo de flotación basal que el grupo control presentó fue el más alto (47.25%) y sobresalió de los porcentajes de los grupos sham y SSACC (Fig.34). En la prueba de 24 h posterior a la segunda cirugía, el grupo control disminuyó por debajo de su basal el porcentaje de inactividad dentro del agua sin embargo continuó sobresaliendo de los otros dos grupos. A las 48 h la disminución de inactividad se hizo más evidente ya que obtuvo valores similares a los grupos control y sham. Sin embargo a las 48 h volvió a permanecer inactivo durante un tiempo similar a su basal, este valor fue el más alto que presentó el grupo durante las pruebas posteriores a la segunda cirugía. Al término de las pruebas (96 h), los ratones del grupo control disminuyeron nuevamente su inactividad con respecto a su basal, sin embargo el porcentaje continuó destacando del resto de los grupos.

Por su parte el grupo con manipulación de carótida (sham) mantuvo un tiempo de inactividad constante y similar a su basal a lo largo de las pruebas realizadas después de la segunda cirugía, el porcentaje más bajo se presentó a las 72 h.

El grupo SSACC, 24 h después del corte de la segunda carótida, disminuyó su tiempo de inactividad, sin embargo durante las 48 y 72 h el porcentaje aumentó gradualmente por arriba de su basal, el mayor tiempo de inactividad posterior a la cirugía se presentó a las 72 h. Finalmente en la prueba de las 96 h, el grupo disminuyó su inactividad a un porcentaje similar al registrado en las 48 h manteniéndose así por arriba de su basal.

Al comparar el tiempo de flotación dentro del agua entre los grupos sham y SSACC, se encontró que el grupo SSACC generó los tiempos más altos de inactividad durante las 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda cirugía (*p=0.000).

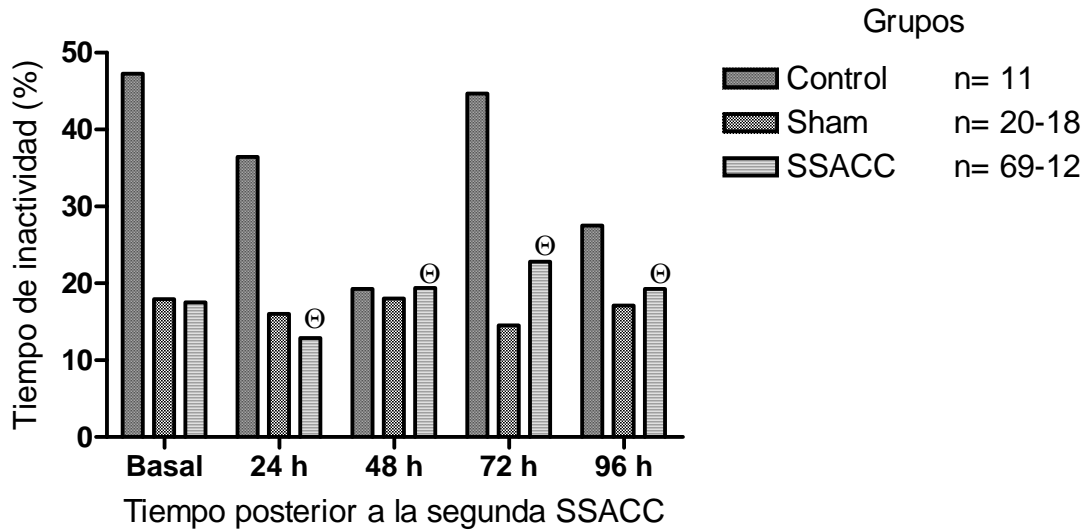


Figura 34. La gráfica muestra las medianas del periodo de inactividad que realizaron los grupos experimentales dentro del agua durante las 24, 48 y 72 h. La abscisa representa el tiempo después de la segunda cirugía y la ordenada el tiempo de flotación expresada en porcentaje. Θ *p<0.05; Mann-Whitney, diferencias entre el grupo sham y SSACC.

4.2.3 Patrón conductual

Primera Cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda.

Grupo control

El 75% de los animales que integraron este grupo, realizaron durante la medición de los valores basales un nado recto y el 100% lo hizo con un ángulo horizontal. El porcentaje de ratones que nadó en zigzag fue de 25%. Durante la prueba, el 33% tocó las paredes, 16.67% tocó la plataforma y regresó y 25% movió su tren anterior. En las siguientes 24 h, el patrón conductual presentó algunas variaciones: el porcentaje de nado recto aumentó al 90.91%, el ángulo permaneció en 100%, los animales que realizaron un nado en zigzag fueron pocos, aproximadamente el 9.09% de la muestra. Por otro lado se incrementó la conducta de tocar las paredes de la alberca a 36.36% y el tocar la plataforma y regresar a 27.27% este último porcentaje fue el mismo obtenido por la incidencia en el movimiento del tren anterior. En el registro de las 48 h se observaron cambios en la conducta de tocar la plataforma y regresar (9.09%) así como en la frecuencia de los movimientos del tren anterior (18.18%), el resto de los parámetros permaneció sin cambios. A las 72 h la frecuencia de tocar la pared disminuyó hasta obtener 9.09%, por el contrario el movimiento de tren anterior aumentó a 27.27%. El resto de los parámetros permaneció sin cambio. En la prueba, a las 96 h, el total del grupo (100 %) realizó un nado recto con ángulo horizontal y sólo el 36.36% de ellos movió el tren anterior durante la tarea (Fig.35).

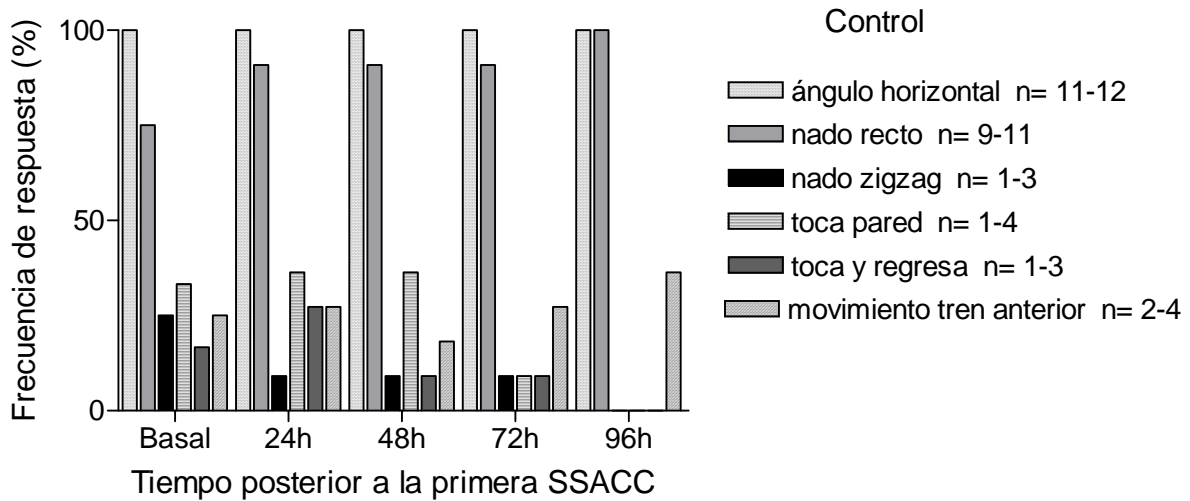


Figura 35. Evaluación conductual a las 24, 48, 72 y 96 h después de la primera cirugía. Nótese que al término del experimento el grupo perfecciona su nado, al realizarlo con un ángulo horizontal y nado recto. Sin embargo hasta este momento el movimiento del tren anterior continuó presentándose.

Grupo Sham

La prueba realizada previo a la primera cirugía (basal), reveló que el 88.89% de los ratones nadó en línea recta hacia la plataforma con un ángulo de nado horizontal para el 100% del grupo. Una pequeña parte de la muestra correspondiente al 11.11% realizó la tarea con un nado en zig-zag, la conducta de tocar las paredes se hizo presente en el 25.93% de los ratones, el porcentaje más pequeño observado fue de 7.41% y correspondió a tocar la plataforma y regresar. Durante la ejecución de la tarea, se observó que los movimientos de tren anterior fueron realizados por el 29.63% de los animales (ver Fig.36). 24 h después de manipular la arteria izquierda, se presentó una disminución tanto del nado recto (78.26%) como del ángulo horizontal (95.65%), y un incremento en el nado en zig-zag (17.39%) La frecuencia en que se tocaron las paredes de la alberca también aumentó (34.78%). Se observó poca variación con respecto al registro basal en las

conductas de tocar la plataforma y regresar (8.70%) y el movimiento del tren anterior (30.43%). A las 48 h el nado recto y el ángulo horizontal continuaron bajando a 56.52% y 91.30%, respectivamente. El nado en zigzag volvió a aumentar a 26.09% y el 4.35% de los animales comenzaron a presentar un ángulo vertical. Tanto el tocar las paredes como el movimiento de tren anterior alcanzaron los porcentajes más altos de 39.13% y 43.48% respectivamente, de forma contraria el tocar y regresar disminuyó a 4.35%. Transcurridas 72 h, el nado recto incrementó su frecuencia (86.36%), sin embargo, el ángulo horizontal bajó nuevamente (81.82%), esta disminución se reflejó en el aumento del ángulo de nado vertical (13.64%). El nado en zig-zag también disminuyó (9.09%) junto con la frecuencia de tocar las paredes (27.27%) y el movimiento del tren anterior (40.91%). La conducta que tuvo un ligero incremento fue la de tocar la plataforma y regresar pues se colocó en el 9.09%. A las 96 h el nado recto logró un aumento a 95.45%, y sólo un 4.55% de los ratones presentaron un nado en zig-zag. El nado con ángulo vertical desapareció por lo que se observó una ejecución de la conducta de nado del 100% en ángulo horizontal. Las conductas que prevalecieron fue el tocar las paredes (22.73%) y el movimiento del tren anterior (18.18%).

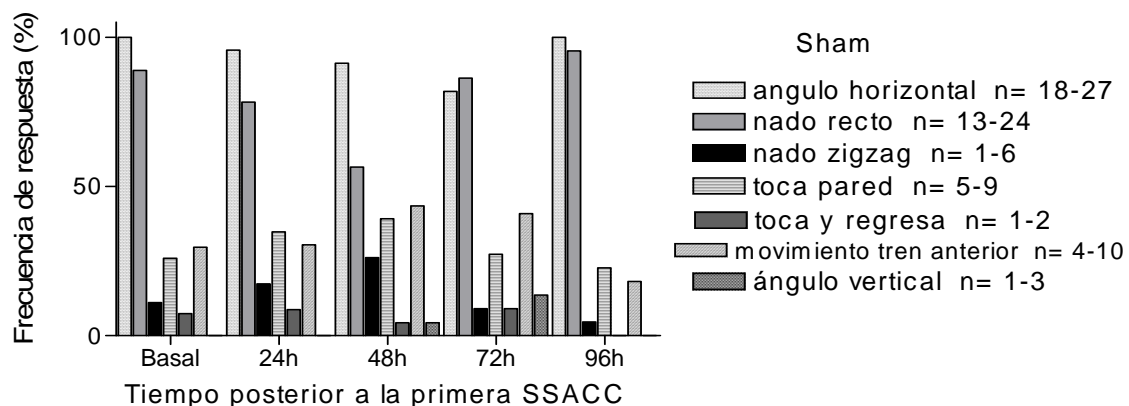


Figura 36. Patrón conductual del grupo sham a las 24, 48, 72 y 96 h después de la primera cirugía. Nótese que a partir de las 72 h el patrón conductual muestra recuperación.

Grupo SSACC

El registro basal de los animales de este grupo mostró un nado recto por parte del 93.52% de los animales y un ángulo horizontal del 98.15%. La incidencia del nado en zig-zag correspondió al 6.48% y apenas el 1.85% presentaron ángulo vertical. Poco más del 25% de la muestra tocó las paredes de la alberca, un porcentaje similar (23.15%) movió el tren anterior y sólo el 8.33% tocó la plataforma y regresó (Fig.37). Después del corte de la carótida izquierda (24 h), los animales de este grupo redujeron su nado recto (70.73%) y su ángulo horizontal (85.37) e incrementaron la presencia de nado en zig-zag a 17.07% y el ángulo vertical a 7.32%. Incrementó el porcentaje correspondiente a la conducta de tocar la plataforma y regresar (19.51%) y el movimiento del tren anterior (36.59%). El tocar las paredes de la alberca permaneció cercano al 25%. Al realizar la prueba de las 48h, el nado recto ganó porcentaje (82.43%) el ángulo permaneció dentro del porcentaje de las 24 h (85.14%). La frecuencia del nado en zig-zag fue de 12.16% y la del ángulo vertical incrementó a 10.81%. Permanecieron con muy poca variabilidad el tocar las paredes (25.68%) y el movimiento del tren anterior (36.49%). Por su parte la conducta de tocar y regresar disminuyó a 8.11%. A las 72 h después de la cirugía, el grupo continuó mostrando un nado recto y en ángulo horizontal con porcentajes de 85.14% y 87.84%, respectivamente. Un porcentaje de 10.81% presentó nado en zig-zag y el 8.11% mostró el ángulo vertical, 8.11% también tocó la plataforma y regresó. La conducta de tocar las paredes incrementó a 35.14% sobrepasando su basal y en el caso del movimiento de tren anterior su porcentaje bajó a 31.08%. En la última medición, realizada a las 96 h se mantuvo el valor observado a las 72 h del nado recto (85.14%), el ángulo horizontal disminuyó a 86.49%, el nado en zig-zag bajó a 9.46%, en tanto que el ángulo vertical fue el mismo que el registrado durante la prueba de las 72 h. El movimiento del tren anterior mostró un porcentaje del 37.84% que además fue el más alto registrado. Por otro lado, la

frecuencia de tocar las paredes como el tocar y regresar disminuyó a 22.97% y 6.76%, respectivamente.

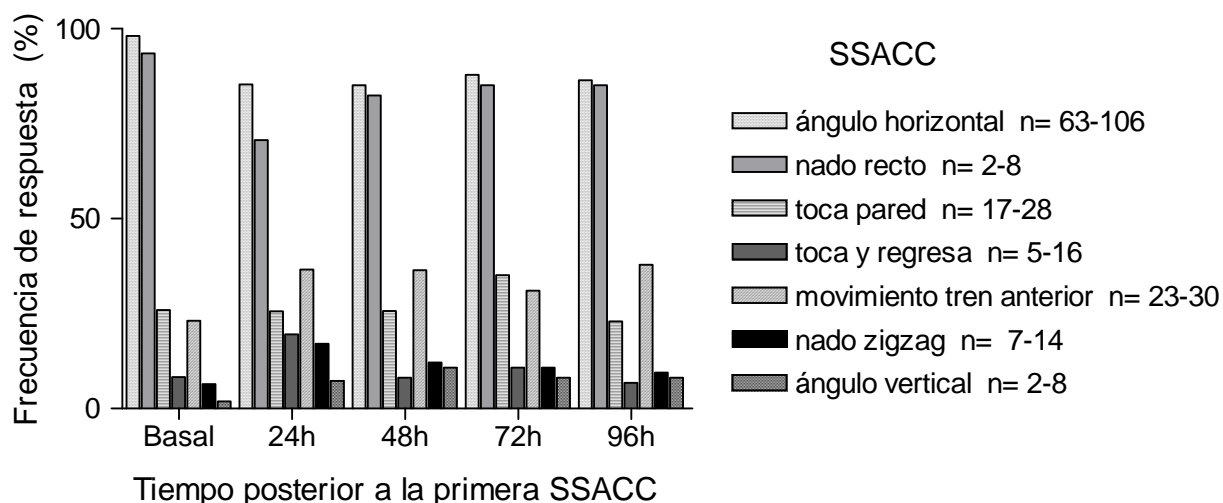


Figura 37. Desempeño del grupo SSACC antes y a las 24, 48, 72 y 96 h después de la primera cirugía. Nótese que el patrón conductual presenta variaciones similares a partir de las 48 h.

Segunda Cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 después de la primera cirugía.

Grupo control

Durante la obtención de la basal y hasta la prueba de las 48 h, el 100% del grupo presentó un nado con ángulo horizontal y el 90% realizó la prueba de nado en forma recta, y el 10% nadó en zigzag, tocó las paredes y tocó la plataforma y regresó al punto de inicio. Durante la basal el 30% de los animales movió el tren anterior. Para las 72 h, cuatro de las seis conductas se presentaron. El 100% del grupo realizó el nado en forma recta y con un ángulo horizontal, la frecuencia en tocar las paredes incrementó a 20%. El movimiento del tren anterior después de perderse a las 24 h reapareció a las 72 h, al

realizarlo el 20% de los animales. Finalmente a las 96 h la conducta de tocar la pared se perdió y el nado, ángulo y movimiento de trenes fue el mismo que a las 72 h (ver Fig.38).

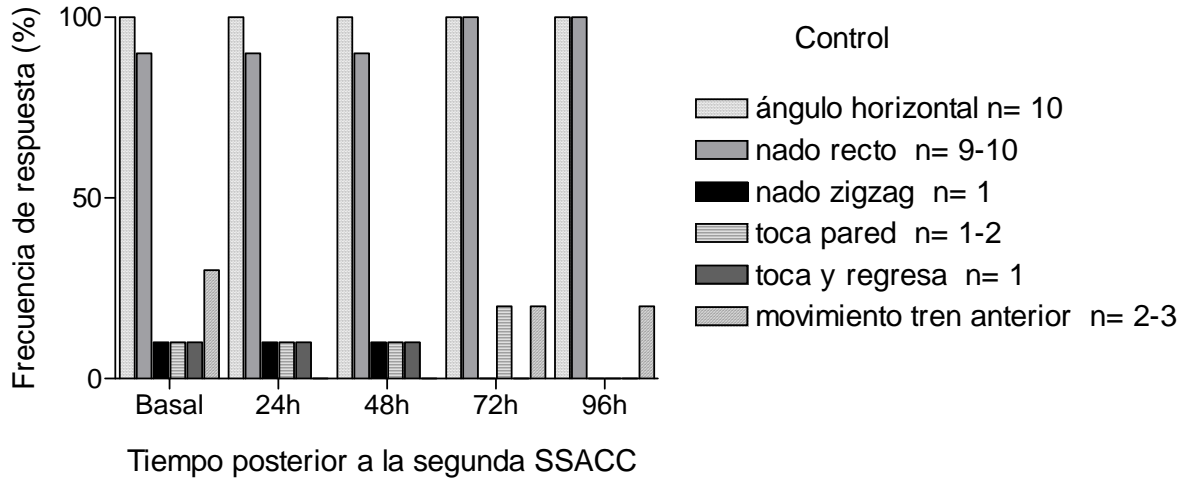


Figura 38. Pruebas de nado del grupo control antes (basal) y a las 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda cirugía. Nótese que el máximo porcentaje de nado y ángulo se presentó a las 72 hrs y el movimiento del tren anterior fue la única conducta adicional que persistió a las 96hrs.

Grupo Sham

Previo a la segunda cirugía el 85% del grupo sham mostró un nado recto y el 15% en zigzag. Todo el grupo presentó un desplazamiento en ángulo horizontal. 25% de los animales tocó la pared, 10% tocó la plataforma y regresó, y el 30% movió el tren anterior (ver fig.39). El nado recto aumentó a 89.47% 24 h después de la manipulación de la carótida, el ángulo permaneció igual que la basal, el 15.79% del grupo tocó la pared, 5.26% tocó la plataforma y regresó al punto de inicio y 10.53% movió el tren anterior, éstas conductas disminuyeron sus porcentajes. En las siguientes 48 h incrementó el tocar las paredes (42.11%) y el movimiento del tren anterior (15.79%). El resto de las conductas permanecieron con los mismos porcentajes que en la medición de las 24 h. Para las 72 h se presentó una leve disminución al 88.89% del nado recto y un incremento en la

frecuencia del nado en zigzag al 11.11%. El ángulo de nado horizontal se modificó a 94.44% dado que el 5.56% realizaron la tarea con un ángulo vertical. La conducta de tocar la plataforma y regresar se perdió por completo pero fue mayor la frecuencia de tocar la pared (16.67%). El porcentaje de los animales que tuvieron movimiento del tren anterior disminuyó a 11.11%. Al término del experimento (96 h) el grupo recuperó su nado recto y en ángulo horizontal (100%), solo prevaleció la conducta de tocar la pared (27.78%) y el movimiento del tren anterior (16.67%) ambos incrementaron con relación a las 72 h.

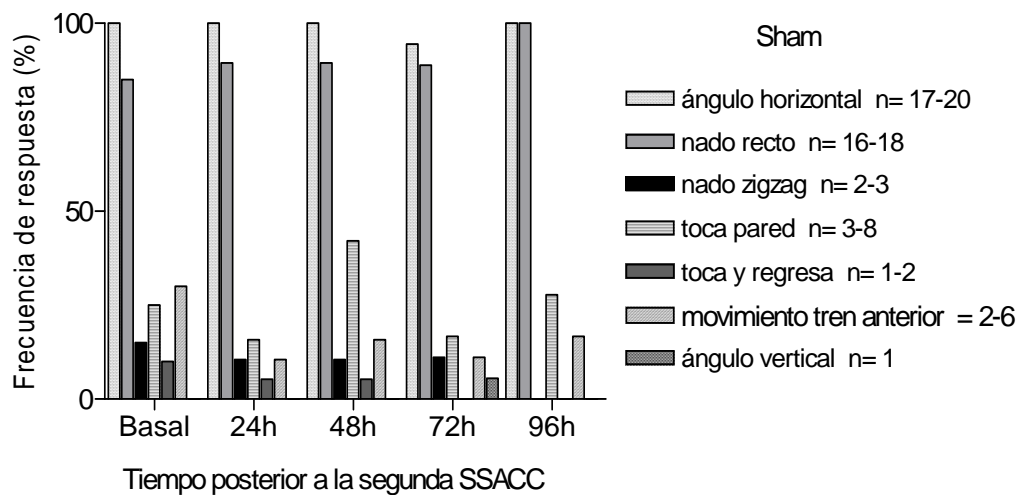


Figura 39. Conducta de nado del grupo sham antes (basal) y 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda cirugía. Nótese que el ángulo horizontal y el nado recto permanecieron durante las 96 h después de la cirugía, el patrón de nado fue mejor que el presentado durante la basal.

Grupo SSACC

Este grupo se desempeñó en la tarea con un nado recto, la mayoría de ellos (97.10%) lo hizo en ángulo horizontal, sólo el 2.90% lo realizó con un ángulo vertical. El porcentaje de 31.88% correspondió a los animales que movieron el tren anterior, 13.04%

a los que tocaron la pared y 7.25% a quienes tocaron la plataforma y regresaron. Pese a que el 100% de la muestra logró adquirir un ángulo de nado horizontal 24 h después de la cirugía, el nado recto se vió afectado al reducirse a 66.67% de tal forma que el nado en zigzag se presentó en el 29.63% de los ratones (Fig.40). Durante este periodo también aumentó por arriba de sus basales la frecuencia de tocar las paredes (44.44%), tocar la plataforma y regresar (22.22%) así como los movimientos del tren anterior (55.56%). Al transcurrir las 48 h el nado recto recuperó porcentaje (81.82%) sin embargo, el ángulo horizontal (86.36%) se perdió en algunos animales de la muestra, ya que el 4.55% se desplazó con un ángulo de nado vertical. Se presentaron con menor frecuencia el nado en zigzag (13.64%), tocar la pared (18.18%) y tocar la plataforma y regresar al punto de inicio (4.55%). Por su parte el movimiento del tren anterior continuó aumentando hasta 72.73%. A las 72 h, la reducción del nado recto y el ángulo de nado horizontal se hizo más notorio al obtener ambos un porcentaje de 64.71%. El resto de las conductas se incrementaron de la siguiente manera: el movimiento del tren anterior lo realizó el 94.12%, este porcentaje fue el más alto en relación a los registros de las 24, 48 y 96 h; el ángulo de nado vertical lo desarrolló el 17.65% de los animales, mientras que el 41.18% tocó las paredes de la alberca. El porcentaje de este grupo que nadó en zigzag fue el mismo que tocó la plataforma y regresó al punto de inicio (23.55%). En la prueba de las 96 h, el nado recto regresó al porcentaje obtenido durante las 24hrs (66.67%), el porcentaje final que alcanzó este grupo en el ángulo horizontal fue del 75%, sin embargo, este incremento se mantuvo por debajo del registro basal y de las mediciones de las 24 y 48 h. Por su parte el nado en zigzag y el ángulo vertical disminuyeron su frecuencia pues sólo estuvo presente en el 16.67% del grupo. De igual forma el porcentaje de animales que tocó la pared (33.33%) y quienes tocaron la plataforma y regresaron al punto de inicio (8.33%) fue menor al de la prueba de las 72 h, ambos porcentajes permanecieron por encima de su basal. Finalmente el movimiento de tren anterior fue la conducta que se presentó con

mayor frecuencia (91.67%) entre los animales del grupo SSACC y permaneció por arriba de su basal.

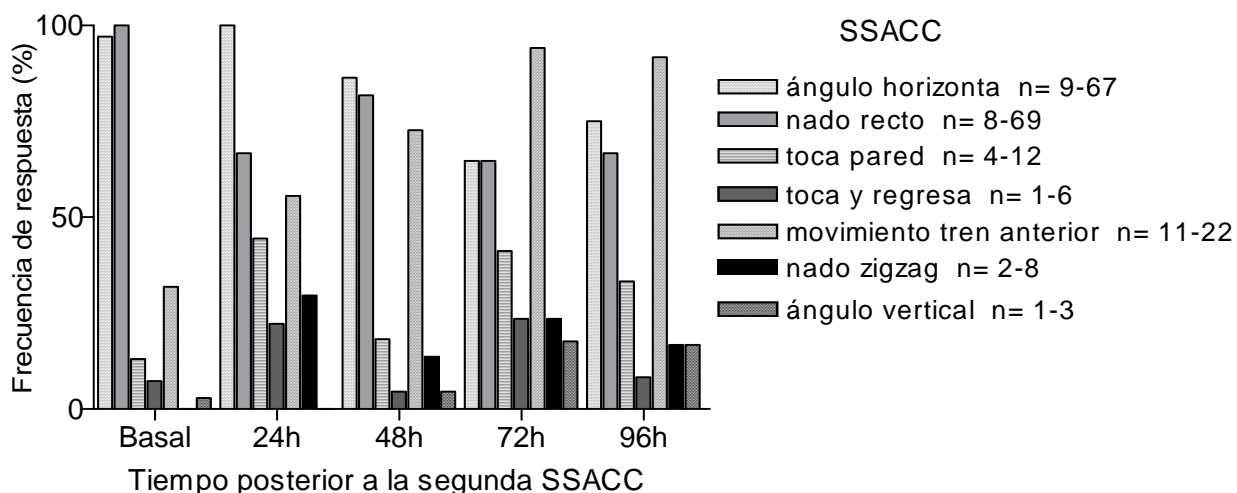


Figura 40. Patrón conductual del grupo SSACC antes y a las 24, 48, 72 y 96 h después de la segunda cirugía. Nótese que la disminución más notable en la conducta de nado recto ocurre a las 24 h, en los siguientes registros ésta permanece muy cercana al ángulo de nado horizontal. La única conducta que aumentó de manera marcada su incidencia fue el movimiento del tren anterior.

4.7 Efectos del Fármaco sobre la mortalidad

La mortalidad del grupo SSACC disminuyó en los animales a quienes se les administró el fármaco a dosis baja de 32 mg/kg y dosis alta de 128 mg/kg, en comparación con los animales tratados con solución salina. El mayor número de muertes se presentó durante las primeras 24 h después de la cirugía (36/69). Cabe señalar que en ninguno de los grupos se presentaron muertes a las 72 h (ver Fig.41). Los porcentajes de sobrevida para el grupo que recibió 32 mg/kg fueron 53.33% a las 24 h y 33.33% a las 48 y 96 h. En el grupo de animales que recibieron la dosis alta del fármaco se obtuvieron los siguientes porcentajes de sobrevida 66.67%, 46.67% y 33.33% a las 24, 48 y 96 h, respectivamente. El grupo que recibió solución salina obtuvo porcentajes de sobrevida de

62.50%, 37.50% y 12.50%, a las 24, 48 y 96 h respectivamente. De acuerdo con la prueba de rangos logarítmicos no se encontraron diferencias significativas entre las curvas.

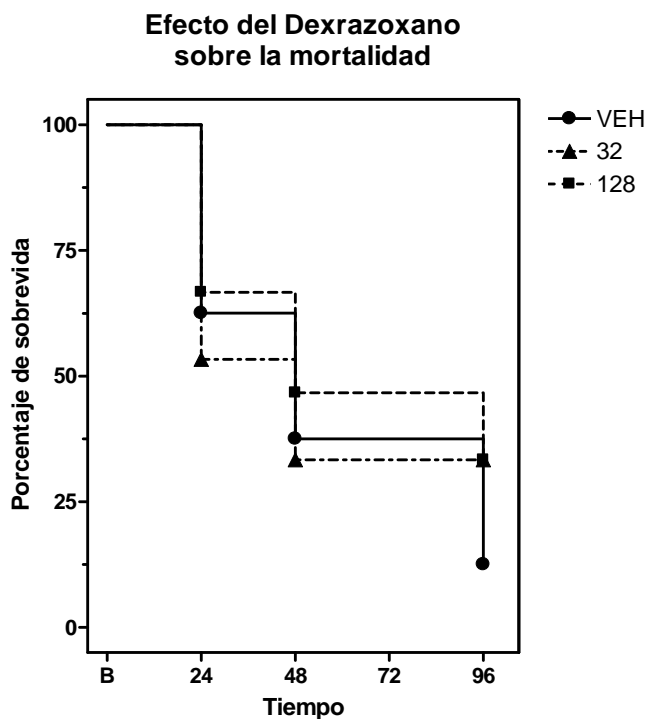


Figura 41. Efecto del fármaco sobre la mortalidad del grupo SSACC. Cada curva de supervivencia representa a los animales del grupo SSACC que fueron tratados con dosis baja (\blacktriangle 32mg/kg), alta (\blacksquare 128mg/kg) y (\bullet) vehículo, quince minutos después de la segunda cirugía. La abscisa representa el tiempo después de la cirugía; las ordenadas el porcentaje de supervivencia. Las curvas de supervivencia fueron calculadas por el método Kaplan-Meier y comparadas usando la prueba de rangos logarítmicos. No se observaron diferencias entre las curvas.

4.8 Efectos del fármaco sobre la ejecución de nado

La comparación de los datos obtenidos después de la segunda cirugía entre los grupos SSACC del experimento preliminar (sin fármaco) y el experimento 2 (con fármaco), generó los siguientes resultados.

Los ratones del grupo SSACC administrado con dexrazoxano, llegaron a la plataforma en un tiempo de latencia y una distancia de recorrido menor a la realizada por el grupo SSACC sin fármaco. De manera similar, el grupo SSACC administrado con fármaco, efectuó la prueba a una velocidad mayor que el grupo sin fármaco; en contraste, los ratones del grupo sin fármaco permanecieron por un mayor tiempo inactivos (o en flotación) dentro del agua, que aquellos ratones a los que se les administró el dexrazoxano.

La ejecución de nado entre los grupos SSACC con y sin fármaco, mostró diferencias significativas únicamente en el tiempo de llegada a la plataforma (latencia; $*p=.033$; Mann-Whitney) y en el tiempo de inactividad que los ratones invirtieron dentro del agua ($*p=.032$; Mann-Whitney), ambos 24 h después de la segunda cirugía.

El registro extra reflejó que en las 96 h después de la segunda cirugía, los ratones con fármaco aumentaron mínima mente su latencia de llegada a la plataforma y la distancia de recorrido. Su velocidad fue la misma que la empleada en el registro previo (72 h) mientras que el tiempo de inactividad o flotación disminuyó en comparación con la prueba anterior (72 h).

Pruebas	Latencia		Distancia		Velocidad		Flotación	
	(seg)		(m)		(m/s)		(%)	
Basal	4.75	3.70	0.81	0.57	0.18	0.13	12.85	17.50
24 h	7.80*	7.65	0.86	0.91	0.14	0.12	8.90	12.90*
48 h	5.30	7.70	0.85	1.26	0.14	0.15	12.00	19.40
72 h	16.55	6.50	1.12	0.93	0.08	0.12	23.35	22.80
96 h	-	7.55	-	1.06	-	0.12	-	19.25

Tabla 4. En la siguiente tabla se muestran las medias de la ejecución de nado registradas por el grupo SSACC durante la basal y después de la segunda cirugía (24, 48, 72 y 96 h). Los valores ubicados en la columna izquierda corresponden al grupo SSACC sin tratamiento del experimento preliminar, mientras que la columna derecha corresponde a los valores del grupo SSACC administrado con dexrazoxano del experimento 2.

4.9 Efectos del fármaco sobre el patrón conductual

Al comparar el patrón conductual correspondiente a la segunda cirugía de los grupos SSACC se observó que a partir de las 48 h el patrón mostró un comportamiento diferente entre los grupos con y sin fármaco pertenecientes al primer y segundo experimento. Los animales que recibieron el fármaco (Fig. 42) presentaron un nado recto de manera consistente a diferencia del grupo sin fármaco que lo perdió casi por completo. El ángulo recto permaneció con porcentajes similares, sin embargo, el nado en zigzag y el ángulo vertical se redujo considerablemente en el grupo con fármaco, así como las conductas de tocar la pared y tocar la plataforma y regresar. Solo el movimiento del tren anterior mostró un aumento en los animales que recibieron el fármaco. En la tabla 4 se presentan los porcentajes obtenidos por ambos grupos durante los experimentos.

Tabla 5. A continuación se presentan los porcentajes obtenidos en el patrón conductual de cada una de las conductas evaluadas en la segunda parte del experimento correspondiente al corte de la segunda carótida del grupo sin fármaco (tabla superior) y el grupo administrado con Dexrazoxano (tabla inferior).

Experimento preliminar (Sin Fármaco)	Ángulo horizontal	Nado recto	Toca pared	Toca regresa	Mov. Anterior	Nado zigzag	Ángulo vertical
Basal	95%	93%	27%	18%	16%	10%	5%
24hrs	90%	81%	30%	30%	30%	10%	10%
48hrs	90%	50%	50%	40%	60%	30%	10%
72hrs	70%	10%	70%	50%	60%	50%	30%

Experimento 2 (Con Fármaco)	Ángulo horizontal	Nado recto	Toca pared	Toca regresa	Mov. Anterior	Nado zigzag	Ángulo vertical
Basal	97.10%	100%	13.04%	7.25%	31.88%	-	2.90%
24hrs	100%	66.67%	44.44%	22.22%	55.56%	29.63%	-
48hrs	86.36%	81.82%	18.18%	4.55%	72.73%	13.64%	4.55%
72hrs	64.71%	64.71%	41.18%	23.53%	94.12%	23.53%	17.65%
96hrs	75%	66.67	33.33%	8.33%	91.67%	16.67%	16.67%

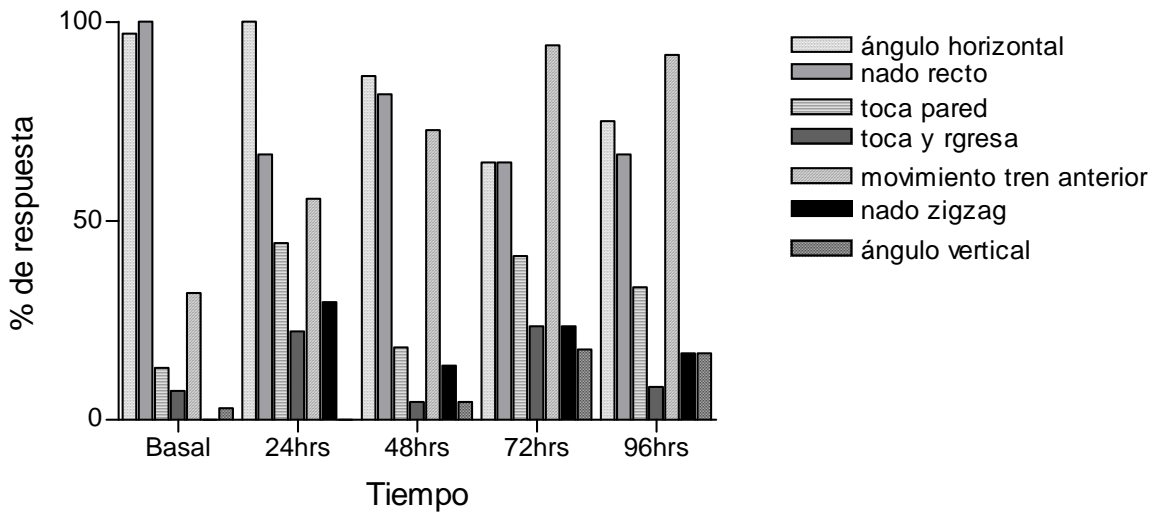
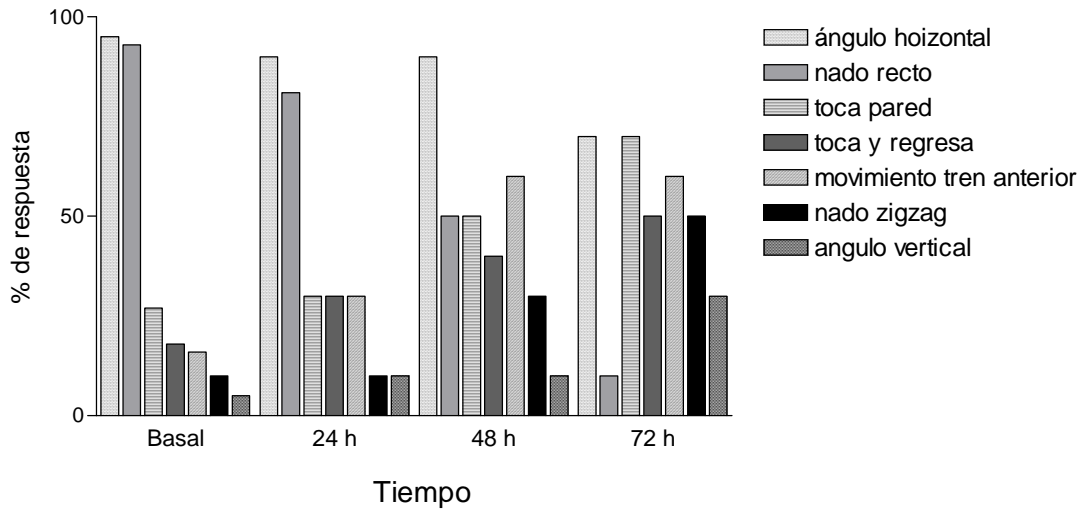


Figura 42. Comparación del patrón conductual del grupo sin fármaco (arriba) y el grupo con fármaco (abajo). Cada gráfica representa la ejecución que los animales del grupo SSACC tuvieron después de la segunda cirugía. La abscisa indica el tiempo después de la cirugía y la ordenada el porcentaje de incidencia de las conductas examinadas.

4.10 Análisis histológico

En los tres grupos experimentales (control, sham y SSACC), los cortes de los encéfalos teñidos con TTC previo a la primera cirugía, presentaron un color rojo intenso considerado como tejido cerebral sin daño isquémico (n=9), estos cortes cerebrales formaron las basales de cada grupo. La siguiente muestra obtenida 96 h después de la primera cirugía mostró que el área cerebral de los grupos control (n=4) y sham (manipulación de carótida; n=9) se tiñó por completo a diferencia de los animales con corte de la arteria carótida izquierda del grupo SSACC (n=16) en cuyos cortes se exhibió una tinción menor correspondientes a zonas de infarto.

Transcurridos treinta y dos días después de la primera cirugía, se evaluaron nuevos cerebros provenientes de cada uno de los grupos (n=13), los resultados obtenidos fueron similares a la tinción reportada 96 h después de la cirugía. Los cortes de los cerebros teñidos 96 h después de la segunda cirugía indicaron las mayores áreas de infarto en los ratones con corte de ambas carótidas (SSACC; n=17) en comparación con los cortes del grupo control (n=8) y sham (n=13) quienes conservaron el tono de su tinción.

Dentro de otras características que se observaron en los cortes fue la intensidad de coloración y el tamaño del cerebro. Los ratones del grupo sham especialmente después de la segunda cirugía, adquirieron un color más rosado en sus cortes, en cuanto al tamaño el grupo SSACC obtuvo una apariencia más reducida en comparación de los cortes de los grupos control y sham.

El contraste generado por la tinción entre las áreas con daño cerebral y las áreas sin daño facilitó la delimitación de las áreas de infarto, las cuales fueron localizadas mediante el programa Proimage. Las áreas de infarto que presentaron lesión con mayor incidencia

fueron la corteza, el hipocampo, el hipotálamo, el núcleo caudado, el putamen, el cerebelo y el tallo. Las observaciones histológicas realizadas en este trabajo fueron apoyadas mediante un nuevo grupo experimental enfocado a caracterizar los cambios histológicos en los cerebros de los ratones durante las 24, 48, 72 y 96 h después de cada cirugía. Actualmente estos cortes se están analizando para obtener el volumen total de isquemia cerebral.



Fig. 43. Cortes coronales (1 mm de grosor) representivos de un áres cerebral de ratones de los grupos control, sham y SSACC teñidos con TTC. En donde A) corresponde a los cortes previos a la primera cirugía (basal), B) cortes posterior a la primera cirugía, C) Basal previo a la segunda cirugía y D) posterior a la segunda cirugía. El tejido que permaneció sin teñir representa el tejido dañado. Nótese que después de la segundo cirugía se observa una mayor área de tejido dañado.

5. Discusión

Conducta de nado

El hallazgo más importante obtenido del presente trabajo es la caracterización de las alteraciones motoras en la conducta de nado inducidas por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes, para lo cual se analizó el patrón de nado exhibido por los ratones, para posteriormente evaluar su ejecución e identificar y seleccionar las alteraciones neuroconductuales más consistentes, frecuentes y relevantes.

Se observó que durante el primer contacto que tienen con el agua, los animales en condiciones basales exhiben una serie de comportamientos como saltar, rascar, nadar cerca de las paredes de la alberca, nadar en círculos, etc., que reflejan el estrés causado por la tarea y la búsqueda de una estrategia efectiva para salir del agua. La conducta de nado se desarrolla con episodios de braceo empleando los cuatro miembros, con las falanges extendidas, de manera incoordinada y con una postura vertical, acción que ratifica la capacidad innata que tienen para el nado (Burne, 2006). Durante los ensayos sucesivos, los ratones van modificando su postura dentro del agua hasta obtener una posición horizontal con respecto al nivel del agua (ángulo de nado) y realizan un desplazamiento en línea recta, la inmovilidad del tren anterior es progresiva principalmente en los animales que empiezan a familiarizarse con el agua y aprenden como escapar. Los miembros anteriores son utilizados durante las primeras brazadas o de manera espontánea durante el tiempo de nado mientras que los trenes posteriores proporcionan la mayor fuerza de propulsión. Es a partir de este momento cuando se considera que los roedores tienen la destreza de un nado coordinado. Sin embargo, al igual que reporta Stoltz (1999) algunos ratones de la muestra no dejaron de mover el tren anterior durante todo el experimento lo que indica la presencia de variabilidad biológica.

El patrón de nado que obtuvimos en este trabajo es similar al reportado por Bekoff y Trainer en ratas (1979) en su estudio ontogenético post natal de coordinación de los miembros anteriores y posteriores durante el nado (desde el día 1 hasta el 22 de nacimiento) donde se describe que las ratas desde su nacimiento son capaces de usar los cuatro miembros aunque de manera incoordinada, alcanzando el nado coordinado a los 15 días y a partir de los días 16 a 18 los miembros anteriores dejan de ser usados. Por lo tanto, se entiende que los ratones envejecidos empleados en este experimento así como las ratas empleadas por Bekoff y Trainer, desarrollan la conducta de nado bajo un mismo patrón ontogenético y a cualquier edad.

Ejecución de nado del experimento preliminar

Primera cirugía. Corte de la arteria carótida izquierda

Con respecto a la ejecución de la conducta de nado, el experimento preliminar nos brindó información respecto a la tendencia general de la conducta antes y después de la intervención quirúrgica. Los animales del grupo isquémico (SSACC) sometidos a la primera cirugía, incrementaron su tiempo de latencia y distancia recorrida a las 24 h en comparación con los grupos control y sham de ese mismo registro. Sin embargo, durante las 48 y 72 h los resultados indican que los valores del grupo SSACC presentan una reducción en los tiempos de latencia y distancia los cuales se colocan por debajo de las condiciones basales y con registros similares a los realizados por los grupos control y sham.

Por otro lado, la velocidad mostrada por los ratones del grupo SSACC durante las 24, 48 y 72 h posteriores a la primera cirugía fue la misma mientras que los grupos control y sham la mejoraron. En cuanto al tiempo de flotación los tres grupos incrementaron sus

porcentajes de inactividad dentro del agua durante las tres pruebas posteriores a la primera cirugía.

Los resultados de esta primera fase del procedimiento, revelaron que la latencia de escape está determinada por la distancia y la velocidad de nado, es decir que entre mayor sea la velocidad y menor la distancia recorrida, entonces la latencia será menor. Los hallazgos publicados por Lamberty (1989) referente a los cambios en el aprendizaje y conducta espontánea de ratones hembra, coinciden con el decremento en la latencia observado durante el progreso de los días de prueba en el grupo SSACC. De igual forma el experimento realizado por McAuliffe (2006) en donde se observaron ratones con diferentes grados de hipoxia (45,60 o 75 min), ratifica que el tiempo de latencia disminuye durante los días de prueba en los grupos control y en el de lesión ligera (hipoxia de 45 min). Respecto a la velocidad de nado, estudios previos de Block (1998) no revelaron diferencias significativas entre los grupos sham e isquémicos o entre animales isquémicos con y sin tratamiento.

Como se mencionó anteriormente, los valores altos de latencia presentes en el grupo SSACC a las 24 h comienzan a disminuir a las 48 y 72 h siguientes como se observa en las gráficas de primera cirugía (Fig.10, 11). Esta tendencia a disminuir indica una mejora en la ejecución de la prueba durante el desarrollo del experimento que probablemente se relaciona con los mecanismos adaptativos y compensatorios generados a partir del corte de la carótida izquierda. Lo que sugieren estos datos es que el primer corte de la arteria carótida no produce alteraciones permanentes durante la ejecución de nado, lo cual se correlaciona con los porcentajes de supervivencia reportados después de la primera cirugía y con el alto índice de personas que previo a un evento severo o agudo de isquemia cerebral sufren pequeños micro infartos que pasan desapercibidos para el paciente (Chalela, 2004).

La revisión bibliográfica realizada indica que hasta el momento ninguno de los estudios ha incluido el porcentaje de flotación como una variable que contribuya en la descripción de los efectos en la conducta motora. Por ello consideramos que esta variable podría funcionar como un indicador del grado de daño motor causado por la SSACC así como una referencia del grado de ansiedad que los animales presentan durante la exposición al agua, que nos permite aclarar la difícil disociación del déficit de la memoria espacial de otros procesos de daño motor que se encuentra presente en las investigaciones relacionadas con la conducta de nado o en el modelo de Morris.

Segunda cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía

Transcurridos 32 días de la primera cirugía, se observó que los valores basales obtenidos previo a la segunda cirugía mostraron mejoría en la ejecución de la prueba en cada uno de los parámetros evaluados (latencia, distancia, velocidad y flotación) lo cual se reflejó en los valores similares que registraron los tres grupos. Lo anterior sugiere un estado óptimo de los grupos sham y SSACC. Sin embargo 24 h después de practicar la segunda cirugía, los ratones del grupo SSACC no mostraron evidencia de recuperación como se presentó después de la sección de la primera carótida, por el contrario en los registros de las 48 y 72 h postcirugía se observó un deterioro gradual en función del tiempo que destacó a las 72 h cuando se observaron las mayores alteraciones en los parámetros evaluados (Fig.14-17). Por tanto, los ratones finalizaron la tarea (72 h) con un tiempo de latencia muy elevado, recorriendo una mayor distancia y a una velocidad lenta lo cual provocó que pasaran mayor tiempo sin realizar movimientos en el agua (porcentaje de flotación).

Al igual que en este trabajo, Block en 1996 reportó el incremento en la latencia y la distancia de ratas con oclusión de cuatro vasos (4VO) en comparación con el grupo sham.

Por su parte Kimihiko Hattori y cols (2000) encontraron que los animales sometidos a 90 min de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) exhibieron latencias significativamente más largas para iniciar sus movimientos que los animales a los que se les provocó una oclusión de 60 min o inclusive el grupo sham. Por su parte McAuliffe (2006) observó que mientras más se incrementaba el tiempo de hipoxia, mayores eran los puntajes de latencia obtenidos en ratas.

Una característica más de estos resultados es el desempeño similar de los grupos control y sham lo cual brinda evidencia de que el daño ocasionado por la cirugía no es una variable que este afectando de manera considerable el desempeño de la ejecución de nado.

Ejecución de nado del experimento 2

Primera cirugía. Sección de la arteria carótida izquierda

El empeoramiento del grupo SSACC durante la segunda cirugía fundó la necesidad, de extender el periodo de análisis más allá de 72 hrs para responder a la pregunta de si después de este tiempo los ratones tendrían una mejoría o continuarían empeorando.

La ejecución de la conducta de nado después de la primera cirugía en este experimento, reprodujo la tendencia establecida en el experimento preliminar de incremento en los valores de latencia y distancia a las 24 h para el grupo SSACC comparado con su basal. En el caso de la velocidad, una reducción significativa ocurrió a las 24 h en el grupo SSACC, en este mismo grupo la flotación tuvo su mayor incremento a las 96 h después de la primera cirugía (Fig.27-30). A excepción del tiempo de inactividad o flotación, los valores generados por los grupos sham y SSACC presentan una

recuperación a partir de las 96 h haciéndose más claro en el registro previo a la segunda cirugía.

Segunda cirugía. Sección de la arteria carótida derecha 32 días después de la primera cirugía

Como se puede observar en las gráficas de latencia y distancia de la segunda cirugía (Fig. 31,32) del experimento 2, los resultados refieren un aumento significativo en el tiempo de llegada a la plataforma y la distancia recorrida de los ratones del grupo SSACC a partir de las 24 h por arriba del desempeño de los grupos control y sham, sin embargo, el mayor aumento, se presentó 48 h después de la segunda cirugía. Estos valores disminuyeron a partir de las siguientes 72 y 96 h. Con respecto a la velocidad de nado y la flotación los valores se mantuvieron similares durante todo el tiempo de observación (24, 48 72 y 96 h).

Evidencia generada por otros grupos de trabajo indican que ratones con isquemia (inducida por oclusión de la arteria cerebral media izquierda por 20 min) presentan diversos déficits en la prueba del laberinto de Morris (MWM, por sus siglas en inglés), tardan más tiempo en encontrar la plataforma que el grupo sham y tienden a regresar al punto de inicio (Winter, 2004). Estos datos son consistentes con la ejecución de nado encontrado en el grupo SSACC de este experimento.

Un caso especial lo constituyó el grupo sham ya que se observaron incrementos significativos en su latencia, distancia y velocidad, y en este último parámetro fue el único grupo que obtuvo diferencias significativas con respecto a los valores basales. La alteración en el desempeño de la conducta de nado de los animales de este grupo es posiblemente el producto de daño al localizar y manipular la arteria durante el procedimiento quirúrgico producida por el cirujano y relacionada con el estrés que este

procedimiento representa. Una circunstancia más que apoya esta sugerencia es el nivel mayor de mortalidad en este grupo en contraste con el registrado en el experimento preliminar.

El grupo control fue otro factor notable al presentar los porcentajes de flotación más elevados, esta tendencia sugiere que en estos animales se presentó un proceso de habituación al ambiente experimental ya que como Kikusui (1999) señala, cuando los animales aprenden a resolver la tarea, el ambiente experimental se vuelve familiar, hecho que provoca una reducción en su estrés y una ejecución calmada o lenta.

La variación en la ejecución de nado se explica por medio de una serie de daños a nivel estructural y funcional del cerebro. Klapdor (1996) en su trabajo de análisis de diferencias entre cepas de ratones en la adquisición y ejecución del paradigma de Morris, refiere que Zoladek y Roberts (1976) ubicaron que las ratas tienen un uso predominantemente del sentido visual para la resolución de tareas de orientación espacial en el laberinto radial, por ello consideramos que el aumento en la distancia de nado observada en este trabajo, probablemente esté relacionado con debilidad sensorial visual que dificulta el nado directo de los ratones a la plataforma y que por ende afecte el tiempo de latencia incrementándolo. El daño en la formación hipocampal, principalmente en las vías de conexión de la fimbria y el fornix, producen un daño en el aprendizaje de cómo buscar la plataforma y la inhabilidad de controlar los movimientos de las extremidades, condición que repercute en el tiempo de latencia y la distancia de nado. Wishaw en 1995 elaboró un estudio dedicado a lesionar la fimbria y el fornix de ratas, sus resultados demostraron que las ratas control rápidamente nadaron hacia la plataforma mientras que las ratas con lesión en fimbria-fornix tuvieron problemas para hacerlo como lo indican sus mayores valores de latencia. El daño del estriado también ha demostrado que induce déficit en el aprendizaje espacial que es acompañado por déficits motores, revelado por

un decremento en la velocidad de nado (Block,1997). Bajo este argumento, se fundamenta que la disminución en la velocidad de nado del experimento preliminar registrada en la segunda cirugía es provocada por un déficit motor que también afecta la latencia de nado. Otra explicación de la disminución de la velocidad esta correlacionada con los niveles de dopamina en el núcleo caudado y el número de las células de dopamina en la sustancia nigra. La evidencia de esta idea la sustenta el estudio de Range (1977) realizado en ratas viejas, las cuales al expresar un deterioro de neurotransmisores de dopamina exhiben un daño en la ejecución de nado. Al igual que Range en este trabajo se emplearon ratones envejecidos cuyo desempeño en la ejecución de nado se vio reducido significativamente, el reconocimiento de este patrón en nuestros resultados, fue considerado como punto importante para la explicación de esta alteración.

Histología

De manera general los resultados de este trabajo, indican que la ejecución de la tarea de nado es alterada por el procedimiento de la SSACC y que dichas alteraciones están constituidas por un componente de aprendizaje y otro motor. Se sabe que el modelo de SSACC provoca daños en el hipocampo, en el estriado (globus pallidus y putámen) y la corteza cerebral (Rodríguez, 2000), el análisis histológico confirma la producción de lesión cerebral extensa provocada por el procedimiento pero también integra como nuevas áreas de infarto cerebral al cerebelo y el tallo.

Aunque en el presente trabajo se hizo mención de estructuras cerebrales involucradas en la adquisición de la conducta de nado y en la afectación de la misma, se debe tomar en cuenta que las tareas globales como esta conducta, no está localizada o comandada por una estructura cerebral específica, y que para entender por completo el desarrollo motor incluyendo sus alteraciones, se debe de considerar que en la generación

del movimiento como el requerido en la conducta de nado, existe una interacción conjunta de diferentes sistemas y áreas cerebrales.

Patrón conductual

Concerniente al patrón conductual, el presente estudio confirma que la SSACC está relacionada con la conducta motora en los ratones. Se identificaron 7 alteraciones neuroconductuales más frecuentes y relevantes: ángulo de nado (horizontal o vertical), nado recto, nado en zigzag, hundimiento, toca pared, toca plataforma y/o regresa, movimiento del tren anterior, flotación y rotación. Las conductas de rotación, hundimiento y flotación fueron excluidas del análisis debido su baja incidencia.

Al practicar la primera cirugía se observó que sólo algunos animales de los grupos sham y SSACC exhibieron ligeras alteraciones en su patrón conductual caracterizadas por pérdida del ángulo horizontal, nado recto y aumento en la frecuencia del nado en zigzag y movimiento del tren anterior. Para el grupo sham la mayor afectación ocurrió a las 48 h mientras que el grupo SSACC se presentó 24 h después de la primera cirugía. Transcurridos 32 días de la primera cirugía, la medición de la conducta (basal) indicó que ambos grupos habían recuperado su ángulo horizontal y nado recto, aunque el resto de las conductas permanecían latentes con porcentajes bajos principalmente en el grupo SSACC. Sin embargo, después de la segunda cirugía se observó una marcada diferencia entre el grupo sham y el SSACC, ya que durante las 72 h del experimento el grupo sham fue disminuyendo la frecuencia de conductas alteradas para finalizar con un patrón más parecido al grupo control. Por otro lado, el grupo SSACC en vez de recuperarse de las alteraciones aumentó progresivamente su severidad.

Los estudios realizados por Enthoven y Dalm (2003) en ratones sugieren que existen diversas posturas de nado algunas más horizontales o más verticales con

respecto a la superficie del agua y concluyen, además, que la postura de nado no perjudica en la ejecución de la prueba y tampoco en las habilidades de aprendizaje espacial en el MWM. Los ratones sometidos a la SSACC demostraron que inclusive cuando presentaron un ángulo más inclinado mantuvieron un nado recto lo cual además de ser una muestra de procesos adaptativos y de supervivencia sugieren que el proceso de aprendizaje de llegada y ubicación a la plataforma no se afecta.

En relación con el movimiento del tren anterior, estudios de ratas con lesiones en la corteza motora indican un incremento en el movimiento de los miembros anteriores y un ángulo corporal inclinado a diferencia de las ratas control, quienes sólo emplean sus trenes posteriores para empujarse, y su cola como la directriz en el agua (Gisel, 1982). El movimiento del tren anterior presente en el trabajo de Gisel es explicado como el reflejo de una alteración en la inhibición del control de movimiento relacionada con la lesión de interconexiones sensoriales y motoras. Wishaw (1981) encontró el mismo patrón de inhibición del tren anterior en ratas con remoción de neocorteza, cíngulo, hipocampo y cuerpo calloso en comparación con las ratas control. Por otro lado, Petrosini (1990) mediante la observación realizada en ratas con hemisferectomía, y Schapiro (1970) en su estudio del efecto hormonal en la ontogenia de la conducta de nado en ratas, asumen que el movimiento de los miembros anteriores aparentemente es producto de lesión cerebelosa. Recordemos que tanto el cerebelo como el estriado son estructuras vitales en el control del movimiento y que trabajan conjuntamente en los procesos que involucran el movimiento, es de enfatizar que ambos (cerebelo y estriado) tienen un origen común de desarrollo genético (Bolívar, 1996). Como se mencionó anteriormente el estriado y el cerebelo son estructuras que se afectan mediante la SSACC y como consecuencia afectan el control del movimiento del tren anterior exhibido por los ratones del grupo SSACC.

Con el análisis del patrón conductual se corroboró una vez más que el daño más importante ocurre durante la segunda cirugía, este resultado coincide con el alto índice de mortalidad y con la disfunción en la ejecución de nado reportado en el experimento preliminar. Consideramos que el grado de incidencia de alteraciones funcionales severas que a su vez perjudican en la ejecución del nado y la alta mortalidad observada en los ratones envejecidos podría estar relacionado con procesos de plasticidad biológica del cerebro. Con la edad, esta capacidad plástica disminuye provocando que los ratones no logren recuperarse ante el cuadro de isquemia severo acelerando su muerte (Fuentes, 2002).

La literatura es escasa en lo que se refiere al patrón conductual de la en la prueba de nado, ya que sólo se encuentran un reducido número estudios en los que se mencione la postura y conducta de los roedores en el agua, por lo que consideramos que además de corroborar la presencia de diferentes ángulos en los ratones sometidos a la SSACC, se aportó mayor evidencia acerca del proceso de adquisición de la ejecución de nado, de las alteraciones conductuales motoras que afectan la ejecución que los ratones tienen en esta prueba y el establecimiento de un patrón conductual de nado que permita identificar el efecto de tratamientos farmacológicos.

Evaluación del Dexrazoxano

Los resultados observados en el desempeño del grupo SSACC durante la ejecución de nado reflejan que el dexrazoxano tuvo un efecto positivo en ésta, al generar en la mayoría de los registros una latencia de llegada a la plataforma con el mismo tiempo al presentado en las 24 h o bien en un tiempo menor; la distancia recorrida a pesar de incrementarse notablemente a las 48 h, logró una disminución en tanto que la velocidad de nado estabilizó su velocidad a las 72 y 96 h, la cual fue la misma que empleó en la prueba de las 24 h. Finalmente el nivel de inactividad o flotación se mantuvo con un

porcentaje similar a su basal en todas las pruebas después de la administración del fármaco. Estos resultados difieren a los registros de los animales sin tratamiento del experimento preliminar, quienes posterior a la segunda cirugía, presentaron un deterioro progresivo en su ejecución de nado caracterizado por valores de latencia altos, mayor distancia recorrida a una velocidad más lenta con largos tiempos de inactividad (o flotación) especialmente a las 72 h.

Tomando como punto de referencia la prueba que se realizó a las 72 h y comparando las ejecuciones de nado de los grupos SSACC con y sin fármaco (tabla 4), se observa que los ratones tratados con fármaco presentaron un mejor desempeño en la tarea, ya que ésta fue realizada en un tiempo mucho menor, la distancia también fue menor en tanto que la velocidad empleada fue mayor motivo por el cual los ratones se mantuvieron en movimiento constante reflejado en el bajo porcentaje de flotación, estos datos son un factor más que sugieren la eficacia del dexrazoxano sobre la ejecución de nado.

Los resultados obtenidos en la ejecución de nado del experimento 2 en el grupo SSACC que recibió el fármaco, concuerdan con los experimentos previos realizados por Rodríguez y cols., (2003) los cuales reportan una mejora en el desempeño de la actividad locomotora y la coordinación motora de ratones tratados con dexrazoxano en las pruebas de actividad locomotora espontánea en campo abierto y en el modelo de rotarot.

En el experimento 2, las diferencias en el patrón conductual del grupo SSACC con tratamiento farmacológico ocurrieron en la segunda cirugía, pues en comparación con el patrón del grupo SSACC (sin tratamiento) del experimento preliminar, los ratones con tratamiento farmacológico mejoraron la ejecución de la prueba de nado al mostrar menos alteraciones conductuales, el efecto fue evidente debido a que en la tarea de nado se presentó el aumento del ángulo recto, recuperación del nado recto, disminución en la

frecuencia de tocar la pared, tocar y regresar, nado en zigzag y ángulo inclinado. La conducta de movimiento del tren anterior fue la única que incrementó su incidencia.

Déficits en el aprendizaje, memoria, e inhibición del control motor y de esfínteres son comunes en personas que sufren una isquemia cerebral focal (Schallert, 2006), el modelo de SSACC ha demostrado reflejar estas condiciones. Aún falta explorar más dentro del aprendizaje y la memoria para ello consideramos necesario partir de primera instancia de la caracterización de las alteraciones motoras producidas en la conducta de nado para posteriormente apoyarnos en estos resultados y lograr una discriminación más consistente que explique las alteraciones y mejoras en la conducta producidas por el tratamiento farmacológico.

Finalmente, el patrón de mortalidad generado en el presenta trabajo, así como la diferencia en la ejecución y el patrón conductual de nado de los grupo sham y SSACC revela que el procedimiento de SSACC genera un cuadro severo de isquemia cerebral similar a condiciones clínicas que permite analizar y cuantificar las alteraciones neuroconductuales y evaluar mediante la restauración de funciones conductuales la eficacia de tratamientos neuroprotectores, en este caso, la administración de dexrazoxano, mejoró la ejecución de la conducta de nado y disminuyó la mayoría de las alteraciones conductuales de los animales sometidos a SSACC. Los resultados del porcentaje de sobrevivencia obtenidos tanto en el experimento preliminar como en el definitivo, indican que nuestro modelo de isquemia genera una mortalidad elevada (80%) con la adición del corte de la arteria carótida derecha en ratones con previo corte de la arteria carótida izquierda, estableciendo un patrón de mortalidad consistente al reportado en experimentos anteriores (Rodríguez, 2000). Este patrón se explica de la siguiente manera. Después del corte la arteria carótida izquierda (primera cirugía), el flujo de irrigación cerebral se mantiene por medio de la arteria carótida derecha así como de

mecanismos compensatorios que aumentan el diámetro de las arterias que conforma el polígono de Willis y de nuevos vasos sanguíneos que se generan durante el intervalo de 32 días (Rodríguez, 2000) provocando de esta manera la sobrevivencia de los animales. Sin embargo, para la segunda cirugía los ratones parten de un estado de hipoperfusión crónica que se agudiza al cortar la arteria carótida derecha, al suprimirse en su totalidad el aporte sanguíneo del sistema carotídeo, en consecuencia el sistema vertebrobasilar se establece como única fuente de irrigación sanguínea, mediante la cual subsiste un porcentaje muy bajo del flujo sanguíneo, la mayoría de los ratones mueren aproximadamente quince minutos después del corte. Resulta importante enfatizar que la oclusión de las arterias que este modelo maneja, es permanente a diferencia de otros modelos que sólo es transitorio y tanto la detención como la reperfusión es abrupta (Pulsineli, 1982). A pesar de que la alta mortalidad es una de las principales desventajas de este diseño, se sabe que el modelo de sección secuencial de las arterias carótidas comunes bajo las características descritas en este trabajo, produce alteraciones neuroconductuales profundas susceptibles a cuantificarse (Rodríguez, 2005).

Cabe señalar que a pesar de que el número de muertes fue mayor en los animales administrados con vehículo, no se observó una reducción significativa en la mortalidad de animales tratados con dexrazoxano como Rodríguez y col (2003) reportan. Sin embargo, la severidad del síndrome isquémico observado en los animales con segunda cirugía sí fue menos agudo ya que ninguno de los animales presentó conductas de rotación o lateralización. Por esto nosotros consideramos pertinente realizar un nuevo experimento para ampliar el número de los sujetos de la muestra y determinar si efectivamente el fármaco tiene un impacto significativo sobre la mortalidad. De igual forma sería conveniente emplear una técnica histológica más especializada que permita sustentar que el fármaco es el agente causal de la recuperación o disminución de la mortalidad y la

capacidad de ejecución de la conducta de nado de los ratones y no un posible efecto de neurogénesis que promueva la misma conducta de nado. Un elemento que también debe considerarse son los cuidados post operatorios ya que no es muy claro si los ratones mueren por la severidad del procedimiento o por inanición producto de la debilidad o incapacidad de roer el alimento.

Conclusiones

Este estudio confirma que el modelo de SSACC provoca daño orgánico, un patrón de mortalidad consistente y alteraciones neuroconductuales severas y persistentes que permiten evaluar los efectos de la isquemia cerebral.

El modelo de SSACC integra condiciones que normalmente se presentan en la clínica porque incorpora la idea de provocar un evento isquémico en animales con un daño previo y edad equivalente al grupo de población que sufre en mayor proporción este padecimiento.

La prueba de nado descrita en este trabajo es un procedimiento eficaz y sencillo para cuantificar las alteraciones de la isquemia cerebral inducida por la SSACC y para determinar el efecto de neuroprotección gracias a la marcada diferencia entre los animales del grupo sham y SSACC.

Los resultados indican que la administración de dexrazoxano después del evento isquémico, mejora la ejecución de nado y disminuye las alteraciones producidas por la isquemia en el patrón conductual de nado, sugiriendo con ello la existencia de eficacia neuroprotectora.

Aunque nuestra evaluación se centró en la función motora es necesario probar el posible efecto de neuroprotección en otras áreas de funcionamiento cerebral como el cognitivo.

Estos resultados aportan nueva evidencia dentro del estudio de la neuroprotección y generan un panorama más alentador en futuros tratamientos farmacológicos eficaces en pacientes con isquemia cerebral.

6. Referencias bibliográficas

Afifi, K. A. y Bergman, A. R. (2006). Neuroanatomía funcional, texto y atlas. (2ª ed.). México: McGraw-Hill.

Alcalá, R. J. y González G. R. (2007). Enfermedad cerebrovascular, epidemiología y prevención [Monografía]. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM, 50, 36-39

American Stroke Association (2008). Heart Disease and Stroke Statistics-2008. Dallas: American Heart Association.

Ardila, A. y Ostrosky, S.F. (1991): Diagnóstico del daño cerebral. Enfoque neuropsicológico. México: Trillas.

Bekoff A y Trainer W. (1979): **The development of interlimb co-ordination during swimming in postnatal rats.** Journal of Experimental Biology, 83, 1-11.

Block F y Schwarz M. (1996): **Memantine reduce functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats.** Neuroscience Letters, 208, 41-44.

Block F y Schwarz M. (1997): **Correlation between hippocampal neuronal damage and spatial learning deficit due to global ischemia.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, 56, 755-761.

Block, F. (1999): **Global ischemia and behavioural deficits.** Progress in Neurobiology. 58, 279-295.

Bradberry, J y Phrarm D. (1993): **Stroke.** En J. Dipiro, R. Talbert, G. Yee, G. Matzke, B. Wells, M. Posey. Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. (pp.435-458) United State of America: Appleton & Lance.

Bramlett H y Dietrich D. (2004): **Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences.** Journal of Cerebral Blood Flow y Metabolism, 24, 133-150.

Bolivar V, Manley K y Fentress J. (1996): **The development of swimming behavior in the neurological mutant weaver mouse.** Developmental Psychobiology, 29, 123-137.

Burne T, Johnston A, McGrath J y Mackay-Sim A. (2006): **Swimming behavior and post-swimming activity in vitamin D receptor knockout mice.** Brain Research Bulletin, 69, 74-78.

Castillo J, Álvarez-Sabín, Dávalos A, Díez-Tejedor E, Lizasoain I, Martínez-Villa E, Vivancos J y Zarranz J. (2003): **Revisión de consenso. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica?**. Neurología, 18, 398-384.

Chalela J, Merino J y Warach S. (2004): **Update on stroke**. Current Opinion in Neurology, 17, 447-451.

Chávez O, Flores M, Reyes Chacón M, Chávez R. (2005): **La neuroprotección en disfunción neurológica aguda. Nuevos enfoques terapéuticos dentro del campo de la inmunología del sistema nervioso central**. MEDICRIT Revista de Medicina Interna y Medicina Crítica, 2, 179-185.

Cheng Y, Al-Khoury y Zivin J. (2004): **Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure**. The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics, 1, 36-45.

Culmsee C y Kriegstein J. (2005): **Mechanisms of neuronal degeneration after ischemic stroke-emerging targets for novel therapeutic strategies**. Drug Discovery today: Disease Mechanisms, 2, 463-469.

DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD. (2001): **Cognitive and behavioral assessment in experimental research stroke: will it prove useful?**. Neuroscience Biobehav Reviews. 25, 325-342.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. (1999): **Pathobiology of ischemic stroke: An integrated view**. Trends Neuroscience.22,391-397.

Dirnagl U, Simon Py Hallenbeck J. (2003a): **Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection**.Trends Neuroscience. 26, 248-254.

Doyle K. Simon R y Stenzel-Poore M. (2008): **Mechanisms of ischemic brain damage**. Neuropharmacology, 55, 310-318.

Durukan A, Strbian D, Tatlisumak T. (2008): **Rodent models of ischemic stroke: A useful tool for stroke drug development**. Current Pharmacology Design, 14, 359-370.

Easton J, Hauser S y Martin J. (2006): **Enfermedades Cerebrovasculares**. En D. L. Kasper: Harrison principios de medicina interna (2644-2664). México: McGraw-Hill Interamericana.

Enthoven L, Dalm S, Kloet E y Oitzl M. (2003): **Swim posture of mice does not affect performance in the water maze.** Brain Research, 1003, 36-41.

Fuentes- Vargas, M., Santiago-Mejia, J., Pinzon, E. y Rodríguez, R. (2000): **Age-related susceptibility to brain ischemia in mice.** Drug Development Research, 57, 161-166.

Futrell N y Millikan C. (1996): **Stroke is an emergency.** Disease-a-Month, 42, 199-264.

Gaceta, UNAM (2008). Analizan en Iztacala las propiedades antihipertensivas del zapote blanco. México 4041, 11.

Gisel E, Gruenthal M y Finger S. (1982): **Swimming as a method for assessing motor cortex integrity in the rat.** Brain Research, 239, 649-654.

Gómez C, Santiago-Mejía J, Rodríguez R. 1er Congreso Facultad de Medicina “Dr. Roberto Kretchmer” 2005. Alteraciones motoras inducidas por la isquemia cerebral aguda en ratones.

Gómez C, Santiago-Mejía J, Ventura-Martínez R, Rodríguez R. (2006): **The sunflower seed test: A simple procedure to evaluate forelimb motor dysfunction alter brain ischemia.** Drug Development Research, 67:752-756.

González R, Hirsch J, et al. (2006): Acute ischemic stroke. Imaging and intervention: Springer Science.

Green AR, Odergren T, Ashwood T. (2003): **Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents?** Trends Pharmacological Sciences. 24:402-408.

Guevara M, Rodríguez R, Álvarez A, Riaño A y Rodríguez P. (2004): **Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica.** Revista cubana médica. 43.

Hall ED.(1997): **Acute therapeutic interventiosns. Free radical scavengers and antioxidants.** Neurosurgery Clinics of North America, 8:195-206.

Hattori K, Lee H, Hurn P, Crain B, Traystman R y De Vries C. (2000): **Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in Mice.** Stroke, 31, 1939-1944.

Hazell AS. (2007): **Excitotoxic mechanisms in stroke: An update of Concepts and treatment strategies.** Neurochemistry International, 50, 941-953.

Hossmann, K-A. (2006): **Pathophysiology and therapy of experimental stroke.** Cellular and Molecular Neurobiology. 26, 1057-1083.

Hossmann, K-A. (2008b): **Cerebral ischemia: models, methods and outcomes.** Neuropharmacology, 1-14.

Jordán J, Ikuta I, García-García J, Calleja S y Segura T. (2007): **Stroke pathophysiology: management challenges and new treatment advances.** Journal of Physiology and Biochemistry, 63, 261-278.

Khan S-N, Baziany A, Banigesh A, Hemmings S y Shuaib A. (2000): **Evaluation of an optimal temperature for brain storage in delayed 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining.** Journal of Neuroscience Methods, 98, 43-47.

Kikusui T, Tonohiro T y Kaneko T. (1999): **Simultaneous evaluation of spatial working memory and motivation by the allocentric place discrimination task in the water maze in rats.** Journal of Veterinary Medical Science, 61, 673-681.

Klapdor K y Van der Staay J. (1996): **The morris water-escape task in mice: strain differences and effects on intra-maze contrast and brightness.** Physiology y Behavior, 60, 1247-1254.

Krupinski J, Lopez E, Marti E y Ferrer I. (2000): **Expresión of caspases and their Substrates in the rat model of focal cerebral aschemia.** Neurobiology of Disease, 7, 332-342.

Lamberty Y y Gower A. (1989): **Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from maturity to middle age.** Physiology y Behavior, 47, 1137-1144.

Ledesma L. (2007). Evaluación cualitativa y cuantitativa de la figura compleja del rey en pacientes con evento cerebro vascular. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Psicología, México.

Markus, H. (2004). **Stroke: causes and clinical features.** The Medicine Publishing Company Ltd, 57-61.

McAuliffe J, Miles L y Vorhee C. (2006): **Adult neurological function following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components.** Brain Research, 1118, 208-221.

Morris, R. (1984): **Developments of a water- maze procedure for studying spatial learning in the rat.** Journal of Neuroscience methods, 11, 47-60.

Narushima K, Paradiso S, Moser DJ, Jorge R Robinson RG. (2007): **Effect of antidepressant therapy on executive function after stroke.** British Journal of Psychiatry.;190, 260-265.

Nelles G, Jentzen W, Jueptner M, Müller S. y Diener C. (2001): **Arm training induced brain plasticity in stroke studied with serial positron emission tomography.** NeuroImage, 13, 1146-1154.

Onténiente B, Rasika S, Benchoua A, Guégan C.(2003): **Molecular pathways in cerebral ischemia : cues to novel therapeutic strategies.** Molecular Neurobiology.27, 1-40.

Pebet, M. (2002): **Epidemiología y factores de riesgo.** En F. Micheli, Martín A. Nogués, J. Asconapé, M. Fernández y José Biller.Tratado de Neurología Clínica (pp.390-395) Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Pérez D y Biller J. (2002): **Tratamiento de la enfermedad cerebrovascular isquémica.** En Micheli, Martín A. Nogués, J. Asconapé, M. Fernández y José

Biller. Tratado de Neurología Clínica (pp.445-465) Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Petrosini L, Molinari M y Gremoli T. (1990): **Hemicerebellectomy and motor behaviour in rats.** Experimental Brain Research, 82, 472-482.

Pohjasvaara, T., Vataja, R., Leppävuori, A., Kaste, M. y Erkinjuntti, T. (2002): **Cognitive functions and depression as predictors of poor outcome 15 months after stroke.** Cerebrovascular Diseases, 14, 228-233.

Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pacual-Garvi J, Matías-Guiu j, Roda J yBarcia-Albacar J. (2008): **Modelos Experimentales de isquemia cerebral.** Revista de Neurología, 47, 414-426.

Pulsineli WA, Brierly JB y Blum F. **Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia.** An Neurol, 11, 491-498.

Roda J, Carceller F, Pascual J, Herguido M, González-Llanos, Alonso de Leciñana M, Avendaño C y Díez-Tejedor E. (2008): Modelos animales experimentales en isquemia cerebral. Unidad de Investigación Cerebrovascular. Servicios de Neurocirugía y Neurología. Laboratorio de Cirugía Experimental. Hospital Universitario La Paz. Departamento de Morfología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Range C y Urban U. (1977): **High correlations between number of dopamine cells, dopamine levels and motor performance.** Brain Research, 134, 83-93.

Rogers, D., Campbell, C., Stretton, J. y Mackay, K. (1997): **Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat.** Stroke. 28, 2060-2066.

Rodríguez R., Rodríguez-Boscan, I. Lugo-Sira, D., Vidrio, H., Hong, E., Medina, M. y Herrera, I. (2000): **Bilateral sequential common carotid artery sectioning in mice as a new modal for testing neuroprotective drugs.** Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease, 9, 45-53.

Rodriguez R, Santiago-Mejia J, Fuentes-Vargas M, Ramirez San-Juan E.(2003a): **New strategy to evaluate neurological disability after brain ischemia.** Experimental Biology. 11-15.

Rodriguez R, Santiago-Mejía J, Fuentes-Vargas M, Ramírez San-Juan E. (2003b): **Outstanding neurprotective efficacy of dexrazoxane in mice subjected to sequential common carotid artery sectioning.** Drug Development Research, 60, 294-302.

Rodríguez, R., Santiago-Mejía, J., Gómez, C. y Ramírez, E. (2005): **A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits alter forebrain ischemia in mice.** Journal of Neuroscience Methods, 1-7.

Sacco, R. (2002): Patogenia, clasificación y epidemiología de las Enfermedades Cerebrovasculares. En L. P. Rowland. Merritt de Neurología. (pp.227-239) México: Salvat.

Saeed SA, Shad KF, Saleem T, Javed F, Khan MU. (2007):**Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke.** Experimental Brain Research. 182, 1-10.

Santiago-Mejía J, Fuentes-Vargas M, Rios C, Vidrio H, Rodríguez R.(2004): **Effect of ascorbic acid, dihydrolipoic acid, t-butylhydroquinone and phenylbutylnitron on mortality and neurological impairment induced by sequential common carotid artery sectioning in mice.** Drug Development Research, 63:212-218.

Santiago-Mejía J. (2005a). Efecto neuroprotector de los antioxidants en un modelo de isquemia cerebral aguda, Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, México.

Schallert,T. (2006): **Behavioral test for preclinical intervention assessment.** The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 3, 497-504.

Schapiro S, Salas M y Vukovich K. (1970): **Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat: assessment of central nervous system development.** Science, 168, 147-151.

Secretaria de Salud, (2006).Salud México 2001-2005: información para la rendición de cuentas. México.

Sien Y, Stein J, Ning M, Black-Schaffer RM, (2007): **Comparison of clinical characteristics and functional outcomes of ischemic stroke in different vascular territories.** Stroke. 38, 2309-2314.

Stoltz S, Humm L y Schallert T. (1999): **Cortical injury impairs contralateral forelimb immobility during swimming: a simple test for loss of inhibitory motor control.** Behavioral Brain Research, 106, 127-132.

Tatemichi TK, Desmond DW, Prohovnik I y Eidelberg D. (1995):**Dementia associated with bilateral carotid occlusions: neuropsychological and haemodynamic course after extracranial to intracranial bypass surgery.** Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry.58, 633-666.

Traystman, R. (2003): **Animal Models of global cerebral ischemia.** ILAR Journal, 44, 85-95.

Van der Worp, H. B, y Van Gijn J.(2007): **Acute ischemic stroke**. New England Journal of Medicine, 357, 572-579.

Vicens P, Redolat R y Carrasco M. (2003): **Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones**. Psicothema, 15, 539-544.

Villanueva, J. A. (2004): **Enfermedad vascular cerebral: factores de riesgo y prevención secundaria**. Anales de Medicina Interna, 21, 159-160.

Wang Z, Liu Y y Cui Y. (2005): **Pathways to caspase activation**. Cell Biology International, 29, 489-496.

Whishaw I, Nonneman A y Kolb B. (1981): **Environmental constraints on motor abilities used in grooming, swimming, and eating by decorticate rats**. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 95, 792-804.

Whishaw I, Cassel J y Jarrard L. (1995): **Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where**. The Journal of Neuroscience, 15, 5779-5788.

Winter B, Bert B, Fink H, Drnagl U y Endres M. (2004): **Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching.** Stroke, 35, 191-195.

Wiseman LR, Spencer CM. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. Drugs 1998; 56: 385-403.

Zoladek L y Roberts W. (1978): **The sensory basis of spatial memory in the rat.** Animal Learning & Behavior, 6, 77-81.

Anexo 1

Comparación entre grupos del experimento preliminar

Primera cirugía. Corte de la arteria izquierda

Test Statistics^{a,b}

	Latencia de nado Basal	Latencia de nado 24 h primera cirugía	Latencia de nado 48 h primera cirugía	Latencia de nado 72 h primera cirugía
Chi-Square	.094	3.509	3.042	.018
Df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.954	.173	.219	.991

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Distancia de nado Basal	Distancia de nado 24 h primera cirugía	Distancia de nado 48 h primera cirugía	Distancia de nado 72 h primera cirugía
Chi-Square	.098	2.111	2.849	.223
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.952	.348	.241	.895

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Velocidad de nado Basal	Velocidad de nado 24 h primera cirugía	Velocidad de nado 48 h primera cirugía	Velocidad de nado 72 h primera cirugía
Chi-Square	.105	9.477	5.656	5.477
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.949	.009	.059	.065

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Tiempo de flotación Basal	Tiempo de flotación 24 h primera cirugía	Tiempo de flotación 48 h primera cirugía	Tiempo de flotación 72 h primera cirugía
Chi-Square	2.458	3.137	3.754	.341
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.293	.208	.153	.843

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Segunda cirugía. Corte de la arteria carótida derecha

Test Statistics^{a,b}

	Latencia de nado Basal segunda cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía
Chi-Square	2.685	27.431	30.323	31.028
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.261	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Distancia de nado Basal segunda cirugía	Distancia de nado 24 h segunda cirugía	Distancia de nado 48 h segunda cirugía	Distancia de nado 72 h segunda cirugía
Chi-Square	2.114	29.482	32.137	37.171
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.347	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Velocidad de nado Basal segunda cirugía	Velocidad de nado 24 h segunda cirugía	Velocidad de nado 48 h segunda cirugía	Velocidad de nado 72 h segunda cirugía
Chi-Square	2.340	43.586	42.620	51.876
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.310	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Tiempo de flotación Basal segunda cirugía	Tiempo de flotación 24 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 48 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 72 h segunda cirugía
Chi-Square	9.324	39.513	35.116	38.504
df	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.009	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Comparación entre los grupos Sham y SSACC del experimento preliminar durante la primera y segunda cirugía.

Test Statistics^a

	Latencia de nado 24 h primera cirugía	Latencia de nado 48 h primera cirugía	Latencia de nado 72 h primera cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	349.000	362.500	489.500	219.000	206.000	213.000
Wilcoxon W	454.000	467.500	3045.500	2775.000	2762.000	2769.000
Z	-1.759	-1.598	-.089	-4.278	-4.478	-4.525
Asymp. Sig. (2-tailed)	.079	.110	.929	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Latencia de nado Basal	Latencia de nado Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	469.000	413.500
Wilcoxon W	574.000	2969.500
Z	-.252	-1.004
Asymp. Sig. (2-tailed)	.801	.315

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Distancia de nado 24 h primera cirugía	Distancia de nado 48 h primera cirugía	Distancia de nado 72 h primera cirugía	Distancia de nado 24 h segunda cirugía	Distancia de nado 48 h segunda cirugía	Distancia de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	379.000	456.000	458.500	212.000	192.000	188.000
Wilcoxon W	484.000	561.000	3014.500	2768.000	2748.000	2744.000
Z	-1.402	-.487	-.459	-4.386	-4.693	-4.924
Asymp. Sig. (2-tailed)	.161	.626	.647	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Distancia de nado Basal	Distancia de nado Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	473.000	425.500
Wilcoxon W	578.000	2981.500
Z	-.284	-.860
Asymp. Sig. (2-tailed)	.776	.390

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Velocidad de nado 24 h primera cirugía	Velocidad de nado 48 h primera cirugía	Velocidad de nado 72 h primera cirugía	Velocidad de nado 24 h segunda cirugía	Velocidad de nado 48 h segunda cirugía	Velocidad de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	366.000	377.500	472.500	159.000	154.000	127.500
Wilcoxon W	2922.000	2933.500	577.500	2715.000	2710.000	2683.500
Z	-1.560	-1.422	-.292	-5.202	-5.278	-5.888
Asymp. Sig. (2-tailed)	.119	.155	.770	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Velocidad de nado Basal	Velocidad de nado Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	474.500	457.500
Wilcoxon W	3030.500	3013.500
Z	-.269	-.476
Asymp. Sig. (2-tailed)	.788	.634

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Tiempo de flotación 24 h primera cirugía	Tiempo de flotación 48 h primera cirugía	Tiempo de flotación 72 h primera cirugía	Tiempo de flotación 24 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 48 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	359.500	382.500	478.000	165.500	186.000	184.500
Wilcoxon W	464.500	487.500	3034.000	2721.500	2742.000	2740.500
Z	-1.634	-1.360	-.226	-5.101	-4.786	-4.980
Asymp. Sig. (2-tailed)	.102	.174	.821	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Tiempo de flotación Basal	Tiempo de flotación Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	490.000	439.500
Wilcoxon W	3046.000	2995.500
Z	-.083	-.691
Asymp. Sig. (2-tailed)	.934	.489

a. Grouping Variable: Grupo

Comparación entre grupos del experimento 2

Primera cirugía. Corte de la arteria carótida izquierda

Test Statistics^{a,b}

	Latencia de nado Basal	Latencia de nado 24 h primera cirugía	Latencia de nado 48 h primera cirugía	Latencia de nado 72 h primera cirugía	Latencia de nado 96 h primera cirugía
Chi-Square	6.448	7.181	2.639	.708	.302
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.040	.028	.267	.702	.860

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Distancia de nado Basal	Distancia de nado 24 h primera cirugía	Distancia de nado 48 h primera cirugía	Distancia de nado 72 h primera cirugía	Distancia de nado 96 h primera cirugía
Chi-Square	10.819	1.289	5.401	.713	3.801
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.004	.525	.067	.700	.150

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Velocidad de nado Basal	Velocidad de nado 24 h primera cirugía	Velocidad de nado 48 h primera cirugía	Velocidad de nado 72 h primera cirugía	Velocidad de nado 96 h primera cirugía
Chi-Square	2.016	13.931	6.150	1.555	10.328
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.365	.001	.046	.460	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Tiempo de flotación Basal	Tiempo de flotación 24 h primera cirugía	Tiempo de flotación 48 h primera cirugía	Tiempo de flotación 72 h primera cirugía	Tiempo de flotación 96 h primera cirugía
Chi-Square	.853	.355	1.835	.553	1.747
Df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.653	.837	.400	.758	.417

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Segunda cirugía. Corte de la arteria carótida derecha

Test Statistics^{a,b}

	Latencia de nado Basal segunda cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía	Latencia de nado 96 h segunda cirugía
Chi-Square	4.115	14.793	33.281	29.616	45.789
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.128	.001	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Distancia de nado Basal segunda cirugía	Distancia de nado 24 h segunda cirugía	Distancia de nado 48 h segunda cirugía	Distancia de nado 72 h segunda cirugía	Distancia de nado 96 h segunda cirugía
Chi-Square	.314	13.304	31.448	27.300	46.093
Df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.855	.001	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Velocidad de nado Basal segunda cirugía	Velocidad de nado 24 h segunda cirugía	Velocidad de nado 48 h segunda cirugía	Velocidad de nado 72 h segunda cirugía	Velocidad de nado 96 h segunda cirugía
Chi-Square	.591	26.716	40.757	44.823	53.039
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.744	.000	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^{a,b}

	Tiempo de flotación Basal segunda cirugía	Tiempo de flotación 24 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 48 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 72 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 96 h segunda cirugía
Chi-Square	7.434	32.591	39.474	39.288	52.349
df	2	2	2	2	2
Asymp. Sig.	.024	.000	.000	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo

Comparación entre los grupos Sham y SSACC del experimento 2 durante la primera y segunda cirugía

Test Statistics^a

	Latencia de nado 24 h primera cirugía	Latencia de nado 48 h primera cirugía	Latencia de nado 72 h primera cirugía	Latencia de nado 96 h primera cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía	Latencia de nado 96 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	752.000	1216.500	1306.000	1254.000	916.500	716.500	809.000	628.500
Wilcoxon W	1130.000	1594.500	6256.000	6204.000	5866.500	5666.500	5759.000	5578.500
Z	-2.626	-.566	-.183	-.494	-2.877	-4.581	-3.934	-5.637
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.571	.855	.621	.004	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Latencia de nado Basal	Latencia de nado Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	1028.500	1244.000
Wilcoxon W	5978.500	1622.000
Z	-1.832	-.557
Asymp. Sig. (2-tailed)	.067	.577

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Distancia de nado 24 h primera cirugía	Distancia de nado 48 h primera cirugía	Distancia de nado 72 h primera cirugía	Distancia de nado 96 h primera cirugía	Distancia de nado 24 h segunda cirugía	Distancia de nado 48 h segunda cirugía	Distancia de nado 72 h segunda cirugía	Distancia de nado 96 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	1076.000	1269.500	1296.000	1092.000	913.500	733.000	777.500	625.000
Wilcoxon W	1454.000	1647.500	6246.000	6042.000	5863.500	5683.000	5727.500	5575.000
Z	-.399	-.244	-.243	-1.464	-2.897	-4.459	-4.169	-5.664
Asymp. Sig. (2-tailed)	.690	.808	.808	.143	.004	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Distancia de nado Basal	Distancia de nado Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	951.000	1242.500
Wilcoxon W	5901.000	1620.500
Z	-2.296	-.566
Asymp. Sig. (2-tailed)	.022	.571

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Velocidad de nado 24 h primera cirugía	Velocidad de nado 48 h primera cirugía	Velocidad de nado 72 h primera cirugía	Velocidad de nado 96 h primera cirugía	Velocidad de nado 24 h segunda cirugía	Velocidad de nado 48 h segunda cirugía	Velocidad de nado 72 h segunda cirugía	Velocidad de nado 96 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	601.500	1181.500	1278.000	993.500	705.000	628.500	557.000	577.500
Wilcoxon W	4171.500	5934.500	6228.000	5943.500	5655.000	5578.500	5507.000	5527.500
Z	-3.670	-.780	-.351	-2.055	-4.327	-5.232	-5.814	-6.043
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.435	.726	.040	.000	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Velocidad de nado Basal	Velocidad de nado Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	1187.500	1217.500
Wilcoxon W	1565.500	6167.500
Z	-.891	-.717
Asymp. Sig. (2-tailed)	.373	.473

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Tiempo de flotación 24 h primera cirugía	Tiempo de flotación 48 h primera cirugía	Tiempo de flotación 72 h primera cirugía	Tiempo de flotación 96 h primera cirugía	Tiempo de flotación 24 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 48 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 72 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 96 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	1101.000	1191.500	1225.000	1129.000	738.500	642.500	784.000	627.500
Wilcoxon W	4671.000	5944.500	6175.000	1507.000	5688.500	5592.500	5734.000	5577.500
Z	-.227	-.718	-.667	-1.242	-4.096	-5.127	-4.120	-5.644
Asymp. Sig. (2-tailed)	.821	.473	.504	.214	.000	.000	.000	.000

a. Grouping Variable: Grupo

Test Statistics^a

	Tiempo de flotación Basal	Tiempo de flotación Basal segunda cirugía
Mann-Whitney U	1333.500	1262.500
Wilcoxon W	1711.500	6212.500
Z	-.018	-.446
Asymp. Sig. (2-tailed)	.986	.656

a. Grouping Variable: Grupo

Comparación entre los Grupos SSACC con y sin fármaco después de la segunda cirugía

Test Statistics^a

	Latencia de nado Basal segunda cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	5004.500	5390.000	5897.500	6110.000
Wilcoxon W	14457.500	9668.000	10175.500	10388.000
Z	-2.670	-2.133	-.982	-.472
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008	.033	.326	.637

a. Grouping Variable: Participación en el experimento

Test Statistics^a

	Distancia de nado Basal segunda cirugía	Distancia de nado 24 h segunda cirugía	Distancia de nado 48 h segunda cirugía	Distancia de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	3817.000	5812.000	6059.000	6122.000
Wilcoxon W	13270.000	10090.000	10337.000	10400.000
Z	-5.112	-1.146	-.590	-.443
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.252	.555	.658

a. Grouping Variable: Participación en el experimento

Test Statistics^a

	Latencia de nado Basal segunda cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	5004.500	5390.000	5897.500	6110.000
Wilcoxon W	14457.500	9668.000	10175.500	10388.000
Z	-2.670	-2.133	-.982	-.472
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008	.033	.326	.637

Test Statistics^a

	Velocidad de nado Basal segunda cirugía	Velocidad de nado 24 h segunda cirugía	Velocidad de nado 48 h segunda cirugía	Velocidad de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	4210.000	6177.500	6208.000	6148.000
Wilcoxon W	13663.000	10455.500	15661.000	10426.000
Z	-4.308	-.291	-.228	-.379
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.771	.819	.705

a. Grouping Variable: Participación en el experimento

Test Statistics^a

	Tiempo de flotación Basal segunda cirugía	Tiempo de flotación 24 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 48 h segunda cirugía	Tiempo de flotación 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	5016.500	5383.000	5839.500	6022.000

Test Statistics^a

	Latencia de nado Basal segunda cirugía	Latencia de nado 24 h segunda cirugía	Latencia de nado 48 h segunda cirugía	Latencia de nado 72 h segunda cirugía
Mann-Whitney U	5004.500	5390.000	5897.500	6110.000
Wilcoxon W	14457.500	9668.000	10175.500	10388.000
Z	-2.670	-2.133	-.982	-.472
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008	.033	.326	.637
Wilcoxon W	9294.500	9661.000	10117.500	10300.000
Z	-2.645	-2.150	-1.123	-.689
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008	.032	.261	.491

a. Grouping Variable: Participación en el experimento