



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**ALTERACIONES EN APRENDIZAJE Y MEMORIA INDUCIDAS
POR ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA EN LA EJECUCIÓN DEL
LABERINTO ELEVADO EN CRUZ EN RATONES Y SU
MODIFICACIÓN POR FÁRMACOS NEUROPROTECTORES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

AMALIA ALEJO MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO

REVISORA:

DRA. CORINA CUEVAS RENAUD

COMITÉ DE TESIS:

DRA. MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ ORTIZ

DR. GUSTAVO BACHÁ MÉNDEZ

DR. JULIO ESPINOSA RODRÍGUEZ

”””

Facultad de Medicina



MÉXICO, D. F., CIUDAD UNIVERSITARIA.

NOVIEMBRE, 2011.



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.

**PROYECTO FINANCIADO POR PAPIME
PE302110.**

**AGRADECEMOS LAS FACILIDADES OTORGADAS POR LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO PARA LA CONCLUSIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.**

¡GRACIAS!

A mis padres, Pedro Alejo (qepd) y Petra Martínez, por haberme dado el regalo más codiciado: la vida. Gracias por darme una linda familia, por ser el principal motor de mi vida, por permitirme elegir mi camino de entre tantas opciones disponibles, por darme la oportunidad de equivocarme y descubrir mis intereses, por apoyar cada decisión que tomé, por impulsarme a ser un mejor ser humano, por mostrarme que las fantasías también son indispensables para sobrevivir, pero sobre todo por respetar mi lucha por cada uno de mis sueños. Y aunque hoy, no te encuentras a mi lado *Pedrosky*, sé que estarías muy orgulloso por ver a tu hija feliz y triunfando, porque hiciste un buen trabajo al dejarme reconocer y trabajar mis errores, porque ahora reconozco el valor de la hermosa familia que tengo, *Má*, gracias por esperar, al final lo logré; a ti y a papá los amo infinitamente. Cada reto superado es muestra de mi respeto por su inagotable esfuerzo... no importa si lejos estás, te encuentras en cada recuerdo *Pá*.

A mis hermanos, Gerardo y Beatriz, sin su apoyo esta tesis no habría sido posible. Gracias por su enorme esfuerzo, sé que no ha sido fácil para ustedes pero finalmente, lo logramos. *Geras*, eres una de las personas que merece más que mi cariño, te admiro y te respeto por tu incansable lucha, he aprendido de ti más de lo que puedas imaginar; hoy me alegra poder compartir mis logros académicos y personales contigo. *Wi-Wi*, *Arañita*, etc., etc., aunque el principio de esta nueva etapa fue muy difícil lo hicimos, salimos delante de la mano, hoy compartimos más que buenos momentos, comprendo que estar juntas es más que solo una frase, gracias por todas aquellas tardes que me ayudaste a registrar, me acompañaste al otro lado de la ciudad y apoyaste cada locura. Sé cuánto han sacrificado y aunque no me alcancen las palabras para decirlo, ¡gracias, los adoro! ¡Una león ☺!

A mi mejor amigo, José, gracias por haber estado desde que era sólo una niña que comenzaba a dar sus primeros pasos en la vida y en la escuela, estuviste presente durante una de las etapas cruciales de mi vida y no me dejaste caer, estuviste ahí para ayudarme a levantar el vuelo y continuar. Gracias por todas esas tardes que cuidaste de mí, por secar cada lágrima y secundar cada sonrisa, gracias por todo lo que hiciste y haces por mí, sabes lo importante que eres para mí. ¡Te quiero te quiero!

Patty, mil gracias por ser uno de los pilares de mi vida, gracias por todas esas tardes que juntas lloramos y reímos, por permitirme ser parte de tu familia y por ser parte de la mía. Gracias por haberme escuchado cuando lo necesité, gracias por todos tus abrazos y consejos. Recuerda que a pesar de la distancia sigues en mis pensamientos y eso, no cambiará. Brenda, gracias por ser quien iluminó mis tardes con sus tiernos detalles, por cada sonrisa compartida. ¡Las quiero!

Sue Sue Sue, no podría olvidarme de usted... Aunque por ahora nuestra convivencia tomó un giro distinto, sabe que le agradezco enormemente ser parte de mi vida, gracias por su confianza y cariño. Los días juntos han sido más que lindos, sabe que lo quiero mucho. No importa lo que suceda, siempre será mi Sue sue sue favorito... ¡GxT!

Carrie Banda, aun en la distancia te encuentras en cada uno de mis pensamientos, gracias por compartir conmigo la dicha de ser feliz. Aprendí tantas cosas a tu lado que no podría enlistarlas con facilidad. Tu dulzura y cariño me ayudaron a salir adelante cuando no veía solución alguna; gracias a tu dedicación y pasión por el trabajo me encuentro aquí, tu fortaleza me impulsó y aquí estoy, involucrada en la Psicología, te extraño y te quiero.

A cada uno de los profesores que fueron parte esencial de mi formación: Luis Miguel, Víctor, Pedro, Lourdes, Marina, Carolina, Arnulfo, Leslie, en fin; gracias a todos ustedes por su paciencia, confianza y entrega, sin ustedes no habrían sido posibles muchos de los logros que obtuve cuando fueron parte de mi formación y que sin duda, culminan con esta tesis. Rolando Guajardo, no sabes cómo te agradezco que llamaras mi atención cuando lo necesité, no fue fácil pero estuviste para apoyarme y recordarme que la vida no es placentera si la desperdicias. ¿Recuerdas cuando reconocí que no hacía lo que me gustaba? ¡Estuviste ahí y de verdad mil gracias! A todos gracias por satisfacer mi curiosidad e incrementar mi sed de conocimiento.

Melissa, gracias por compartir parte de tus logros conmigo, el tiempo ha transcurrido desde que te conocí, quién diría que al salvarme de aquel verano en el *limbo* serías una de las piezas clave para encontrarme donde estoy. Verte disfrutar haciendo investigación me dejó ver que todo es posible. Gracias por todo, te quiero.

A la Dra. Claudia Gómez, por ser más que mi tutora. Sin su incondicional apoyo no habría logrado terminar este proyecto y quizá no habría encontrado solución a los retos a los que me enfrenté para lograrlo, no habría conocido a muchas de las personas que hoy me rodean, gracias por recordarme que la vida es más que solo trabajo, por su enorme paciencia, ¡gracias infinitas!

A Corina Cuevas, por todas las pláticas que tuvimos, tanto personales como profesionales, por ser quien me ayudó a redescubrir mi amor por las Matemáticas y la Estadística, por darme la oportunidad de colaborar junto a ti y de desarrollar una de mis vocaciones y más grandes pasiones, alguna vez creí haberlo olvidado pero no fue así. Admiro tu pasión y entrega. También quiero agradecerte por haberme dado la oportunidad de formar parte del grandioso equipo de servicio social, gracias al equipo que ha estado en todo momento, Pam, Jarquin, Gerardo y Jesús, gracias por enseñarme y ser pacientes y por todas esas tardes. ¡Las galletas están guardadas, los quiero los quiero!

A Gustavo Bachá, porque sin saberlo, fuiste una de las personas que me inspiró a formar parte del maravilloso mundo de la Ciencia, pues indirectamente, tu dedicación y pasión por la Investigación me ayudaron a descubrir que éste es mi camino.

A la Dra. Rossy, por todas aquellas pláticas en el laboratorio cuando todos ya se habían ido, por todo lo aprendido dentro y fuera del aula, por sus explicaciones y apoyo. Al Dr. Jacinto, sin su apoyo y paciencia no habría aprendido la cirugía, gracias por ayudarme a resolver hasta los más pequeños detalles. Al Dr. Rodríguez, porque a pesar de mi irreverencia me ha permitido demostrar y demostrarme que soy capaz de lograr mis objetivos sea cual sea el reto, sin importar quién está al frente. A Jaque y a la Dra. Letty, gracias por su incansable apoyo y ánimo en cada nuevo proyecto. Gracias por darme la oportunidad de aprender de cada uno de ustedes y formar parte durante todo este tiempo del laboratorio, fue y sigue siendo, una gran experiencia.

Valeria y Belgica, gracias por todos y cada uno de los momentos que compartimos, son parte importante de los mejores momentos de mi vida. Gracias a las dos por estar cuando las necesité y cuando no era necesario decirlo, gracias por todo, no habría sido lo mismo sin ustedes. Vale, gracias por tu incansable apoyo en la etapa más difícil que a pesar de estar latente sé me dejó mucho más que una lección, me dio la oportunidad de redescubrir el valor de la amistad, ¡nena, te quiero mucho mucho!

Ángel, claro que tienes un lugar importante dentro de este trabajo y en mi vida... Gracias por todos los momentos tan lindos que compartimos, gracias por apoyarme en cada una de mis locuras, por escucharme, por tu comprensión. Ahora entiendo muchas cosas que no eran claras pero que cobran sentido cuando te recuerdo. Gracias por cuidar de mis niños y de mí, tu respeto fue, es y será pieza clave. ¡Te quiero!

Por supuesto, a la Universidad que me permitió lograr más de una vez mis objetivos, por darme el cobijo para integrarme a gente maravillosa que trabaja en proyectos de diversa índole en cada una de sus facultades. Gracias por la enorme oportunidad de conocer campos del conocimiento tan diversos y permitirme desarrollarme como ser humano y profesionalista. Porque en mi paso por las facultades hice grandes amigos y fui feliz. Víctor, eres una de las personas más importantes en mi vida te quiero mucho, gracias por tu apoyo y tus palabras de aliento cuando creí no poder, por esas tardes de tarea; no sé qué habría hecho sin ti, gracias por estar cerca muy cerca de mí. Sabes que si eres feliz yo lo soy más y aunque el tiempo y nuestras actividades pudieran distanciarnos, escuchar tu sonrisa alegrará mis días, ¡te quiero! Óscar (Cone-Cookies) gracias por todo ese tiempo compartido, por lo mucho que aprendí de ti, por recordarme cuán feliz soy si me detengo a disfrutar de los detalles, ¡te extraño! A mis compañeros de CDeI (FC), gracias por haber hecho de mi estancia uno de los mejores momentos al lado de las Matemáticas, siempre recordaré su paciencia, apoyo y curiosidad por mi trabajo. ¡Y sigo en Ciencias☺!

A ti, por recordarme que aun cuando somos tan volubles, si algo es cierto, es lo que sentimos. Gracias por cada sonrisa, por esos abrazos que significan más de lo que podría describir, por ayudarme a encontrar *la llave* del baúl de los recuerdos y dejar atrás el miedo. Gracias por cada tierna mirada, por cada sonrisa prohibida a la luz de los secretos, no hay más palabras para decirlo, fuimos presa de sus miradas...*Dame sólo un beso que me alcance hasta morir, como un vicio que me duele, quiero mirarte a los ojos; y cuando te me acercas se acelera mi motor, me da fiebre, me hago fuego y me vuelvo a consumir... Por cada risa llena de felicidad, por cada sueño hecho realidad, gracias por estar conmigo; tú me diste alas y me enseñaste a volar... todo empezó en el momento indicado, sabes lo importante que eres a pesar de la adversidad... Es tu mirada que me hipnotiza como un sol...* No importa si llegaste al final, *estás aquí* para mí, porque el tiempo es irrelevante si te vas y aunque cambien nuestros argumentos, los recuerdos no se van.

A quienes estuvieron y continúan a mi lado, porque tuve y tengo tantas lecciones a su lado que no podría ser de otra forma. Esos buenos momentos no los cambiaría, aun si lo pensara una y cien veces.

Y, finalmente a la parte más importante de todas: mis niños, mis hermosos bebés. Gracias por acompañarme cada tarde y cada loco fin de semana de evaluación; sin ustedes no habría sido posible. No importa si los humanos no lo entienden, sé lo feliz que fui a su lado, gracias por permitirme aprender de ustedes más de lo que esperaba. ¡Siempre los extrañaré!

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMEN | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| I. MARCO TEÓRICO..... | 12 |
| 1.1 Isquemia cerebral aguda | 12 |
| 1.1.1 Definición y clasificación | 12 |
| 1.1.2 Patofisiología | 15 |
| 1.2 Vasculatura del sistema nervioso central..... | 20 |
| 1.2.1 Sistema carotídeo..... | 21 |
| 1.2.2 Sistema vertebrobasilar..... | 21 |
| 1.3 Consecuencias clínicas de la isquemia cerebral | 22 |
| 1.3.1 Alteraciones en aprendizaje y memoria inducidas por isquemia cerebral aguda | 23 |
| 1.4 Modelos experimentales en isquemia cerebral aguda..... | 24 |
| 1.5 Modelo de sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC)..... | 25 |
| 1.5.1 Características del modelo | 25 |
| 1.5.2 Alteraciones conductuales inducidas por la SSACC..... | 26 |
| 1.6 Estrategias experimentales para el estudio de aprendizaje y memoria | 27 |
| 1.6.1 Laberinto acuático de Morris (MWM)..... | 30 |
| 1.6.2 Laberinto radial (RAM) | 30 |
| 1.6.3 Laberinto en T..... | 31 |
| 1.6.4 No igualación demorada a la muestra (DNMS) con olores u objetos | 32 |
| 1.7 Modelo de laberinto elevado en cruz (EPM) | 32 |
| 1.8 Fármacos neuroprotectores | 33 |
| II. MÉTODO..... | 36 |
| 2.1 Justificación..... | 36 |
| 2.2 Preguntas de investigación..... | 37 |
| 2.3 Objetivos..... | 38 |
| 2.3.1 Objetivos generales | 38 |
| 2.3.2 Objetivos específicos | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4 Hipótesis | 38 |
| 2.4.1 Hipótesis de trabajo | 38 |
| 2.4.2 Hipótesis estadísticas | 39 |
| 2.5 Variables bajo estudio | 39 |
| 2.5.1 Determinación de variables..... | 39 |
| 2.5.2 Definición conceptual y operacional de variables..... | 39 |
| 2.6 Unidad experimental | 41 |
| 2.7 Diseño experimental | 41 |
| 2.7.1 Criterios de inclusión | 41 |
| 2.8 Animales | 42 |
| 2.9 Procedimiento | 42 |
| 2.9.1 Aparatos | 44 |
| 2.9.2 Procedimiento quirúrgico..... | 45 |
| 2.9.3 Prueba farmacológica..... | 46 |
| 2.9.4 Mortalidad | 46 |
| 2.9.5 Evaluación de la lesión isquémica | 46 |
| 2.10 Análisis estadístico | 47 |
| III. RESULTADOS | 48 |
| 3.1 Experimento preliminar | 48 |
| 3.2 Experimento final | 57 |
| IV. DISCUSIÓN | 71 |
| V. CONCLUSIONES | 78 |
| 5.1 Limitaciones | 79 |
| 5.2 Sugerencias | 79 |
| VI. REFERENCIAS | 81 |
| VII. ANEXO | 90 |
| 7.1 Definiciones | 90 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--|
| EVC | Enfermedad Vascul ar Cerebral |
| ml/min/100 g | Miligramos por minuto por cada 100 gramos de tejido |
| min | Minutos |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TIA | Ataque Isquémico Transitorio (por sus siglas en inglés) |
| h | Horas |
| ATP | Adenosín Trifosfato |
| Na ⁺ -K ⁺ | Bomba sodio-potasio |
| Na ⁺ | Ión sodio |
| K ⁺ | Ión potasio |
| Ca ²⁺ | Ión calcio |
| COX | Enzima ciclooxigenasa |
| nNOS | Sintasa de Óxido Nítrico neuronal |
| NO | Óxido Nítrico |
| NMDA | Receptor glutamatérgico ionotrópico N-Methyl-D-Aspartato |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SSACC | Sección secuencial de las arterias carótidas comunes |
| EPM | Laberinto elevado en cruz |
| TL | Latencia de transferencia |
| BS | Brazo de salida del laberinto |
| BR ⁺ | Brazo reforzado |
| R ⁺ | Reforzador |
| seg | Segundos |
| cm | Centímetros |
| i. p. | Intraperitoneal |
| TTC | Clorhidrato de Trifeniltetrazodiu m |
| 4VO | Modelo de oclusión de 4 vasos |
| 2VO | Modelo de oclusión de 2 vasos |

RESUMEN

Uno de los principales abordajes en el estudio de las alteraciones inducidas por la isquemia cerebral, es la identificación del déficit cognitivo subyacente mediante tareas sencillas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue proponer una tarea que permitiera identificar y evaluar las alteraciones en la ejecución (aprendizaje) y el recuerdo (memoria) inducidas por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC), así como el efecto neuroprotector del dexrazoxano. Se emplearon ratones macho envejecidos (40 a 60 semanas de edad) de la cepa CFW Taconic. El experimento se estructuró en cuatro fases: entrenamiento, línea base, adquisición y recuperación, en las cuales se reforzó el ingreso al brazo izquierdo cerrado del laberinto elevado en cruz. Bajo anestesia leve con éter, los animales fueron sometidos a la sección de la arteria carótida izquierda. Treinta y dos días después, se realizó el mismo procedimiento con la arteria contralateral. Para evaluar la eficacia neuroprotectora del fármaco se administró una dosis alta (128 mg/kg) o baja (32 mg/kg) de dexrazoxano y solución salina a los animales del grupo isquémico 15 min después de la segunda cirugía. En la tarea evaluada se registró el número de ejecuciones correctas (número de ingresos al brazo reforzado). La prueba conductual se realizó antes (basal), 24, 48, 72 y 96h después de la cirugía, así como siete días tras la última evaluación (fase de recuperación).

Palabras clave: aprendizaje, memoria, isquemia cerebral, neuroprotección, laberinto elevado en cruz.

INTRODUCCIÓN

Si bien el cerebro humano representa el 2% del peso corporal, éste recibe aproximadamente el 15% del gasto cardíaco y consume alrededor del 20% del oxígeno utilizado por el organismo. El flujo sanguíneo total del cerebro es de unos 750-1000 ml/min, de éstos, aproximadamente 350 ml fluyen por cada arteria carótida y unos 100-200 ml lo hacen por el sistema vertebrobasilar (Kandel, Schwartz, & Jessell, 2000; Scremin, 2004).

Entre los trastornos neurológicos graves más frecuentes se encuentran las enfermedades vasculares cerebrales (EVC), que son procesos de instalación súbita. La insuficiencia del riego sanguíneo cerebral se denomina *isquemia*, si es temporal, los signos y síntomas pueden resolverse con pocos o ningún signo anatomopatológico de lesión tisular. La isquemia no sólo priva de oxígeno y glucosa a los tejidos, también impide la eliminación de metabolitos con potencial efecto tóxico, tales como el ácido láctico. Cuando la isquemia es suficientemente grave y duradera, las neuronas y otros elementos celulares mueren, este trastorno se denomina *infarto*. Con frecuencia, la oclusión arterial aterotrombótica se asienta en la arteria carótida interna en lugar de afectar a los vasos intracraneales. Dentro de la sintomatología clínica se observa una amplia variedad de manifestaciones que van desde aquellas reversibles, como las hemiplejías; hasta las irreversibles, que incluyen déficits sensoriales o cognitivos que impiden a los pacientes la realización de sus actividades cotidianas, modificando sus estilos de vida y la reincorporación a su vida previa a un EVC (Block, 1999; Corbett & Nurse, 1998; Secretaría de Salud, 2001). Las manifestaciones clínicas de la isquemia cerebral aguda dependen de la localización, severidad y duración del déficit de perfusión (Bradberry & Phrarm, 1993).

Debido a su alta prevalencia, las EVC constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, pues generan una notable discapacidad física, mental y laboral, además de generar un importante gasto sanitario debido al número de recursos que consume en los sistemas de salud. Por ejemplo, se calcula que Estados Unidos gasta cerca de \$25 billones de dólares en el tratamiento y rehabilitación, ya que se estima la presencia anual de 500,000 nuevos casos, a los que se atribuyen 150,000 muertes y, aproximadamente 3 millones de sobrevivientes con graves secuelas físicas y mentales que van de moderadas a severas (Gorelick, 1994; Secretaría de Salud, 2001). En el caso de nuestro país, este grupo de enfermedades constituye un problema de salud pública debido al elevado número de

muertes registradas, es decir, 26,000 defunciones por EVC, así como al incremento en los factores de riesgo, entre los que se encuentran la hipertensión arterial (HTA), las dislipidemias y la obesidad, además de la elevada ingesta de alcohol y el tabaquismo, que incrementan la probabilidad de padecer un infarto cerebral (Gorelick, 1994). Cabe mencionar que estas enfermedades se presentan principalmente en los adultos mayores; por ello, es de destacar que, en el caso de México, este grupo poblacional aumentó de 4.1 millones en 1996 a 7.1 millones en el año 2000 con un progresivo incremento de los mismos; de hecho, se estima que para el año 2050 existirán en nuestro país 32.4 millones de adultos mayores, lo cual representará el 25% de la población total (Secretaría de Salud, 2001) y alerta a los sistemas salud a mejorar sus campañas preventivas, tomando en cuenta la escalada poblacional que vive nuestro país.

Como se mencionó, es posible observar en los sobrevivientes a un infarto cerebral una amplia variedad de manifestaciones clínicas, de las cuales, las alteraciones en la función motora han sido, durante muchos años, el principal objetivo dentro de la rehabilitación post-infarto; sin embargo, recientemente, los déficits cognitivos y emocionales han cobrado importancia por su significativa contribución en la calidad de vida de los pacientes, sus familiares y sus profesiones. Por ello, es importante evaluar los efectos terapéuticos de los fármacos neuroprotectores, tanto en la reducción del volumen del infarto como en la mortalidad, en ausencia de cualquier beneficio que pudiera tener un mínimo impacto en la calidad de vida de los pacientes o en los costos de los sistemas de salud. Por ejemplo, los reportes clínicos indican que tras un infarto isquémico existen déficits cognitivos que pueden ser clasificados en alguno de los tres grupos básicos de daño identificados, que tienen diferentes efectos en memoria: 1) daño en áreas límbicas, que parece causar pérdida de memoria declarativa predominantemente; 2) infartos en el diencefalo (incluido el tálamo), que producen básicamente déficits en memoria procedural y, finalmente, 3) daño en el cerebro anterior, que produce una pérdida más general de la función cognitiva. Es importante señalar que la presencia de cualquier déficit cognitivo después de un infarto tiene correlación con una pobre recuperación a largo plazo (Hunter, Mackay, & Rogers, 1998; Secretaría de Salud, 2001).

Gracias a la identificación de la influencia del déficit cognitivo en la rehabilitación de los pacientes, se desarrollaron diferentes líneas de investigación para estudiar

experimentalmente el déficit cognitivo inducido por la isquemia cerebral; sin embargo, la mayoría de los grupos de investigación (Bederson et al., 1986; Belayev, Zhao, Busto, & Ginsberg, 1997; Menzies, Hoff, & Betz, 1992; Modo et al., 2000) emplea como herramienta experimental para la inducción de isquemia cerebral modelos focales, habitualmente la oclusión de la arteria cerebral media, ya sea transitoria o permanentemente. No obstante, hasta ahora no hay modelos que evalúen el efecto de la isquemia global y permanente bajo un esquema de hipoperfusión sanguínea previa en los organismos, así como el efecto de neuroprotectores en la reducción del volumen del infarto y la sobrevivencia de los animales. Es trascendental señalar que, a pesar de los reportes conductuales encontrados en la literatura sobre el estudio del efecto de la isquemia cerebral, no se tiene registro de estudios en los que se emplee información referente al repertorio conductual de los sujetos dentro y fuera del ambiente experimental para determinar si los cambios observados en el despliegue conductual afectan el desempeño de los sujetos en las tareas evaluadas, como lo sugieren Corbett & Nurse (1998), de Vries, Nelson, Traystman, & Hurn (2001) y Hunter, Mackay et al. (1998).

Con base en lo anterior, consideramos apropiado proponer y evaluar un modelo conductual que incorpore un parámetro de evaluación del déficit cognitivo que pueda ayudar en la identificación y discriminación entre las alteraciones cognitivas y el daño motor. Para lograr este objetivo, a continuación se presenta un marco de referencia que permitió el diseño de la tarea evaluada con un modelo sencillo, como lo es el laberinto elevado en cruz, que se ha utilizado durante las últimas dos décadas en el estudio de aprendizaje y memoria; se presentan también, el método y los resultados obtenidos, así como las limitaciones y sugerencias de mejoramiento para futuras investigaciones dentro del área.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Isquemia cerebral aguda

1.1.1 Definición y clasificación

La isquemia cerebral aguda, también conocida como enfermedad vascular cerebral (EVC), es el resultado de la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo al cerebro. En esta condición, los niveles de irrigación del tejido cerebral son menores a 30 ml/min/100 g de tejido (Arango-Davila, Escobar-Betancourt, Cardona-Gómez y Pimienta-Jiménez, 2004; Castillo, 2000; Cherubini, Ruggiero, Polidori, & Mecocci, 2005). En contraste, en condiciones normales, el flujo sanguíneo que recibe el cerebro de un adulto joven es de aproximadamente 60 ml/min/100 g (Guevara, Rodriguez, Álvarez, Riaño y Rodriguez, 2004). La evidencia experimental señala que si la duración de este evento se prolonga por más de 5 min el aporte de nutrientes a las células disminuye, particularmente de oxígeno y glucosa, alterando los procesos energéticos involucrados en el mantenimiento de los gradientes iónicos y los potenciales de membrana (Guevara et al., 2004; Juurlink & Sweeney, 1997). Como consecuencia de la disminución en el aporte de energía, se activan varios procesos a nivel celular y molecular a corto y largo plazo que constituyen la cascada bioquímica de daño isquémico que culminan con alteraciones funcionales y la posterior muerte neuronal (Arango-Davila et al., 2004; Back, 1999; Dirnagl, Iadecola, & Moskowitz, 1999; Rodriguez, Rodriguez-Boscan et al., 2000).

Las EVC son procesos de instalación súbita provocadas por la ruptura de vasos sanguíneos que resulta en hemorragia intracraneal (Fig. 1; EVC de tipo hemorrágico), por la obstrucción del flujo sanguíneo arterial debido a la formación de émbolos constituidos por pequeños coágulos sanguíneos en el corazón o en las venas varicosas debido a grasas, gases o acumulaciones bacterianas (Alcalá y González, 2007) o por trombos generados por la formación de placas arteroescleróticas que causan una disminución del flujo sanguíneo al reducirse el diámetro arterial (EVC de tipo isquémico; Alcalá y González, 2007; Bradberry & Phrarm, 1993; Dirnagl et al., 1999; Endres & Dirnagl, 2002). Las enfermedades cerebrovasculares de tipo isquémico dan como resultado la liberación insuficiente de oxígeno y glucosa necesarios para mantener los procesos homeostáticos celulares (Doyle, Simon, & Stenzel-Poore, 2008). A nivel mundial, las EVC se encuentran entre las enfermedades neurológicas con mayor índice de prevalencia, este grupo de enfermedades constituye el tipo

de trastornos más común del sistema nervioso central (SNC; Green, Odergren & Ashwood, 2003). La prevalencia de las EVC de tipo isquémico es mayor que la de tipo hemorrágico, al presentarse en el 87% de los casos; sin embargo, un evento hemorrágico es más letal (Bradberry & Phrarm, 2003). No obstante, ambos síndromes generan manifestaciones clínicas importantes que afectan la calidad de vida de los pacientes (Back, Hemmen, & Schüler, 2004; Bradberry & Phrarm, 2003). En los países industrializados las enfermedades cerebrovasculares son la primera causa de ingreso hospitalario y de discapacidad física y mental en adultos. A nivel mundial se ubican como la tercera causa de muerte en la población mayor de 45 años (American Stroke Association, 2008); en nuestro país, se ubican como la quinta causa de muerte en adultos mayores (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2010). A partir de los 55 años, la incidencia de este grupo de enfermedades incrementa gracias a padecimientos propios del grupo de edad, tales como la formación de placas arteroescleróticas (Villanueva, 2004), diabetes mellitus e hipertensión arterial (Green et al., 2003), tabaquismo o ingesta de alcohol (Gorelick, 1994; Secretaría de Salud, 2001), entre otras.

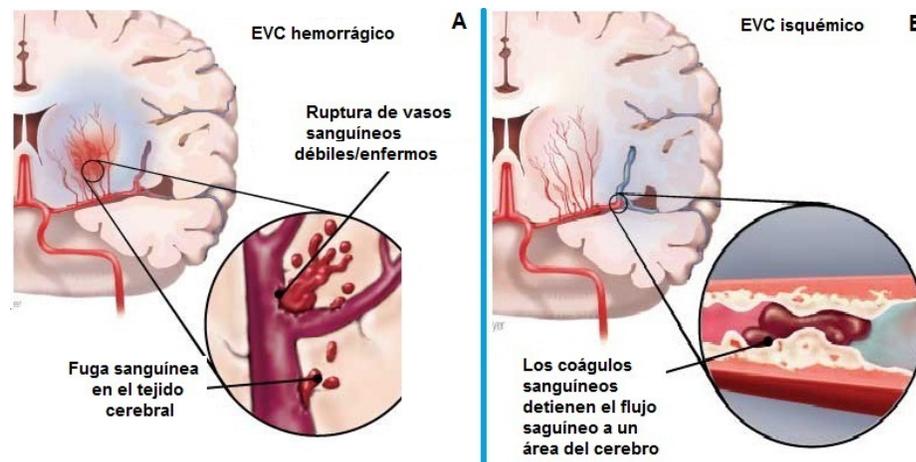


Fig. 1. Tipos de EVC. **A**, Representación de un EVC hemorrágico consecuencia de la ruptura de vasos sanguíneos débiles o enfermos. **B**, La formación de émbolos o trombos impide que el flujo sanguíneo continúe normalmente ocasionando un EVC de tipo isquémico. EVC= enfermedad vascular cerebral. Tomado y modificado de http://www.google.com/imgres?imgurl=http://www.diabeteshypertension.com/images/clip_image004_0016.jpg&imgrefurl=http://www.diabeteshypertension.com/stroke.html&usq=_z83nMuZlr5U-Rsf7HNQpOOLzHlw=&h=258&w=255&sz=12&hl=es&start=0&zoom=1&tbnid=ssORYB3-svGNrM:&tbnh=123&tbnw=122&ei=mtraTcLkLOX00gH786T8Aw&prev=/search%3Fq%3Dischemic%2Bstroke%26hl%3Des%26biw%3D1328%26bih%3D898%26gbv%3D2%26tbnid%3D1328%26itbs=1&iact=hc&vpx=263&vpy=292&dur=1423&hovh=206&hovw=204&tx=92&ty=114&sqi=2&page=1&ndsp=35&ved=1t:429,r:29,s:0&biw=1328&bih=898.

Los estudios morfofuncionales realizados en los modelos experimentales de isquemia cerebral muestran la existencia de un *núcleo isquémico* o *core* (Astrup, Siesjö, & Symon, 1981); alrededor de esta zona tisular dañada se puede observar la presencia de algunas regiones donde el flujo sanguíneo se mantiene parcialmente gracias a los aportes de las arterias colaterales del tejido adyacente isquémico, a estas regiones se les denomina *zona de penumbra isquémica* (Fig. 2; Astrup et al., 1981; Back & cols., 2004; Endres & Dirnagl, 2002; Hossmann, 2006). A pesar de la poca actividad metabólica que tienen las neuronas de esta zona, se encuentran silentes (Astrup et al., 1981; Hossmann, 2006); sin embargo, se estima que si el aporte energético no se restablece, alrededor del 50% de estas neuronas progresa a infarto e incluso muerte neuronal (Back & cols., 2004; Belayev et al., 1997) y, que la supervivencia celular y la recuperación funcional son proporcionales a las neuronas que escapan de la muerte, constituyendo el blanco primario de protección farmacológica (Dirnagl et al., 1999; Jordán, Ikuta, García-García, Calleja, & Segura, 2007).

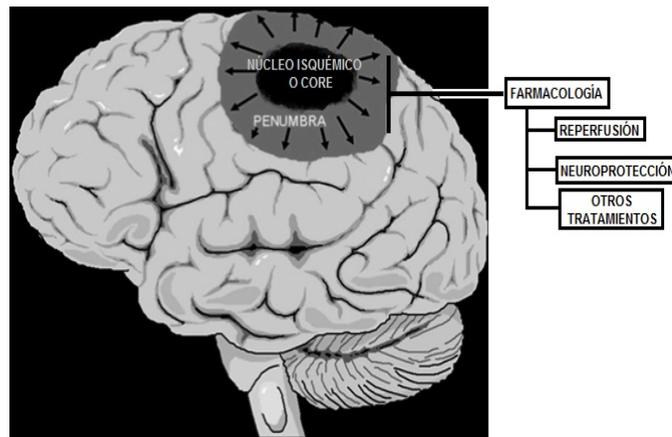


Fig. 2. Núcleo isquémico o *core* y área de penumbra, aproximaciones farmacológicas de tratamiento para el infarto cerebral: restauración de la perfusión cerebral, neuroprotección y otras alternativas (tomado y modificado de Jordán et al., 2007).

La isquemia cerebral puede ser clasificada en dos tipos: focal y global. La isquemia focal se presenta como consecuencia de la reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo en el territorio de una arteria cerebral específica, ya sea por un trombo o un émbolo, manteniendo cierto nivel de irrigación colateral que podría favorecer la supervivencia de las neuronas, así como la reversibilidad del daño neuronal después de períodos de isquemia (Back & cols., 2004; Bradberry & Pharrm, 2003; Endres & Dirnagl, 2002); por este motivo, en algunos casos este tipo de isquemia es considerada como tratable. Por otra parte,

la isquemia cerebral global está asociada a la pérdida del flujo cerebral colateral, el daño presente en el cerebro es irreversible aún cuando se presente durante períodos breves de tiempo, por ejemplo, de 4-8 min (Bradberry & Phrarm, 2003), conduciendo a daño celular irreversible. Además de los tipos ya mencionados, la isquemia cerebral transitoria, también conocida como ataque isquémico transitorio (TIA), es considerada como una subclasificación. Este tipo de isquemia recibe su nombre debido a que la obstrucción de las arterias tiene una duración menor a 24h, habitualmente no produce manifestaciones clínicas graves; sin embargo, puede ser precedente a accidentes vasculares mayores o generar múltiples zonas de pequeños infartos que darían origen al deterioro en la actividad cognitiva del paciente.

1.1.2 Patofisiología

Aunque el cerebro humano representa el 2% del peso corporal, para su buen funcionamiento necesita de altos requerimientos energéticos. Por ejemplo, para mantener los gradientes iónicos y los potenciales de membrana precisa el 20% del oxígeno y la perfusión corporal total, lo que sugiere, en primera instancia, que las neuronas dependen del metabolismo oxidativo para su sobrevivencia celular (Castillo, 2000; Doyle et al., 2008; Endres & Dirnagl, 2002; Juurlink & Sweeney, 1997; Kandel et al., 2000).

La reducción en el flujo sanguíneo cerebral, incluso durante períodos transitorios temporales, puede provocar la pérdida de metabolitos energéticos, favoreciendo el daño neuronal irreversible (Endres & Dirnagl, 2002). Como resultado de la isquemia, se desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo que inicia con fallas energéticas de las células, dando paso a la alteración de la fisiología celular, lo que puede evolucionar a muerte neuronal vía procesos necróticos o apoptóticos (Arango-Davila et al., 2004; Wahlgren & Ahmed, 2004). Entre los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia cerebral se encuentran la acidosis láctica, crisis energéticas, excitotoxicidad, producción de radicales libres, inflamación y apoptosis. Cada uno de estos eventos tiene una evolución temporal diferente, ya que algunos se presentan pocos minutos después del inicio del evento isquémico y otros, horas, días e incluso semanas posteriores a un EVC (Fig. 3; Arango-Davila et al., 2004; Block, 1999; Castillo, 2000; Doyle et al., 2008; Endres & Dirnagl, 2002; Onténiente, Rasika, Benchoua, & Guégan, 2003; Read, Hirano, Davis, & Donnan, 1999). A

continuación se describe cada uno los fenómenos que conforman la cascada bioquímica de daño isquémico.

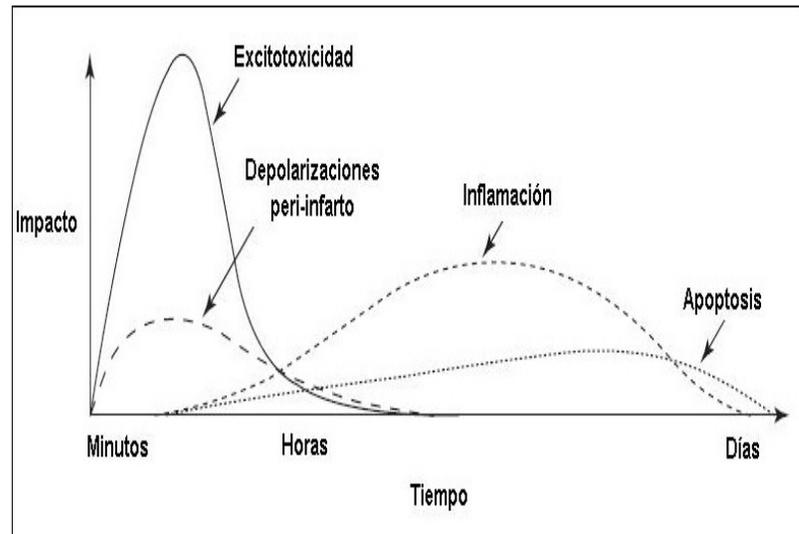


Fig. 3. Cascada de eventos bioquímicos desencadenados durante la isquemia cerebral. Poco después del inicio del déficit de perfusión, los mecanismos excitotóxicos pueden dañar gravemente a las neuronas y la glía. La excitotoxicidad es el preámbulo de una serie de eventos que favorecen la muerte tisular (Tomado y modificado de Dirnagl et al., 1999).

Acidosis láctica

Como consecuencia de la privación de oxígeno, durante los primeros minutos posteriores al cese de la irrigación sanguínea, el metabolismo de la glucosa se modifica, convirtiéndose en un proceso anaerobio donde la glucosa residual se transforma en ácido láctico, permitiendo la acumulación del mismo y la reducción del pH intra y extracelular, debido a la alteración inducida en la respiración mitocondrial (Castillo, 2000; Doyle et al., 2008; Endres & Dirnagl, 2002; Guevara et al., 2004; Hossmann, 2006). La cantidad de ácido láctico formado depende tanto de la cantidad de depósitos tisulares de glucosa como de glucógeno al momento de instaurarse la isquemia. Tras esta alteración se produce una hiperglucemia persistente que genera una excesiva acidosis capaz de agravar el daño cerebral, gracias a la producción de radicales libres (Castillo, 2000; Castillo et al., 2003; Guevara et al., 2004).

Crisis energéticas

Como ya se mencionó, el cerebro requiere de grandes cantidades de energía para mantener la transmisión sináptica, el transporte de iones y la preservación de su integridad estructural; al restringirse el aporte de oxígeno y glucosa, la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial permite que éste sea consumido durante los 2 primeros minutos posteriores a la isquemia, ocasionando que tales procesos se afecten debido al fallo en las bombas de Na^+ - K^+ (Doyle et al., 2008). En respuesta, y para ahorrar energía, el tejido cerebral disminuye su actividad eléctrica, este evento es inducido por la salida de K^+ intracelular, dando como resultado la hiperpolarización transitoria de la membrana plasmática. El consumo de ATP es gradual debido a la inhibición de la fosforilación oxidativa y al gasto energético que implica mantener el transporte de Na^+ - K^+ y la integridad estructural de la célula. Después de 5 min de la oclusión arterial, se alcanza un decremento de ATP del 90%; como consecuencia, en el núcleo de un infarto, la actividad de la Na^+ - K^+ -ATPasa en la membrana plasmática y el retículo endoplásmico se inhibe (Bradberry & Phrarm, 1993; Castillo et al., 2003; Doyle et al., 2008; Endres & Dirnagl, 2002). El incremento resultante en los niveles intracelulares de Na^+ y la concomitante extrusión de K^+ inducen una profunda depolarización membranar, que en suma, causa un fenómeno conocido como depolarización anóxica (Onténiente & cols., 2003). Como resultado, se abren los canales presinápticos de Ca^{2+} sensibles a voltaje, aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular e induciendo la liberación excesiva de neurotransmisores excitadores, especialmente de glutamato (Bradberry & Phrarm, 1993; Castillo et al., 2003; Doyle et al., 2008). Por otra parte, en la zona de penumbra isquémica los cambios en la relación Na^+ - K^+ y los niveles de ATP tienen una menor significancia, ya que la depolarización anóxica es sustituida por depolarizaciones intraisquémicas intermitentes (Takeda, Jacewicz, Nowak, & Pulsinelli, 1993), caracterizadas por su corta duración y una repolarización celular rápida. No obstante, con el paso del tiempo el ATP disminuye severamente produciendo depolarización irreversible (Ginsberg, 2003).

Excitotoxicidad

Entre los neurotransmisores que se liberan como consecuencia de la depolarización anóxica, se encuentra el glutamato; su liberación excesiva y las alteraciones en los mecanismos de recaptura glutamatérgicos provocan la excitotoxicidad (Castillo, 2000; Dirnagl et al., 1999; Doyle et al., 2008; Endres & Dirnagl, 2002; Hossmann, 2006; Juurlink & Sweeney, 1997; Onténiente & cols., 2003). El desencadenante más importante de todos los eventos subsecuentes que inducen la ruptura y muerte celular, es el incremento de Ca^{2+} intracelular, ya que puede causar muerte celular aguda o necrosis o iniciar eventos moleculares que dan paso a la apoptosis o muerte celular programada (Dirnagl et al., 1999). El Ca^{2+} actúa como un segundo y tercer mensajero universal capaz de desencadenar la inducción múltiple de cascadas citoplasmáticas y nucleares al activar un número importante de enzimas: 1) enzimas proteolíticas (como la calpaína y la gelsolina), con la consecuente degradación del citoesqueleto y las proteínas estructurales (como la actina, la laminina, la espectrina y la microtubulina asociada a proteínas); 2) la xantina oxidasa y las fosfolipasas (fosfolipasa A_2) que favorecen la degradación de la membrana; 3) la COX que facilita la generación de radicales libres; 4) la nNOS que permite la producción de NO (óxido nítrico) y peroxinitrito derivado del NO por su reacción con el superóxido (Endres & Dirnagl, 2002). La activación de los receptores NMDA y la entrada de Ca^{2+} estimulan a la nNOS que da como resultado el aumento de la síntesis de NO a través de la unión del Ca^{2+} a la calmodulina. La defosforilación de la nNOS vía la calcineurina, produce un incremento en los niveles de NO (Castillo, 2000; Dirnagl et al., 1999). En suma, el resultado final es el daño neuronal irreversible que deteriora las membranas, los sistemas de neurotransmisión, las mitocondrias, inhibe la síntesis de proteínas, activa la síntesis de NO e incrementa la producción de radicales libres (Hazell, 2007).

Producción de radicales libres

Un radical libre o especie reactiva de oxígeno (ROS), es un átomo o molécula capaz de existir independientemente, contiene uno o más electrones no apareados en su orbital más externo, lo que le confiere reactividad química (Halliwell & Gutteridge, 2007). En condiciones normales, los radicales libres están presentes en el organismo manteniéndose en niveles adecuados por medio de mecanismos antioxidantes (Block, 1999; Castillo, 2000; Santiago-

Mejía, Fuentes-Vargas, Rios, Vidrio, & Rodriguez, 2004); sin embargo, durante el evento isquémico y el período de reperfusión se genera una cantidad excesiva de radicales debido, entre otras cosas, al daño mitocondrial subyacente a la acumulación de Ca^{2+} que incrementa la concentración de NO, ocasionando alteraciones de algunos constituyentes celulares como las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos (Castillo, 2000). En las regiones cerebrales con baja o intermitente perfusión sanguínea se forman radicales libres que producen liperoxidación de las membranas plasmáticas y los organelos intracelulares (Hossmann, 2006; Macaya, Munell, Reventós y Ferrer, 1996); la reacción con el óxido nítrico favorece la formación de peroxinitrito, causando reacciones bioquímicas violentas. Algunas de las consecuencias de las reacciones de las ROS son la liberación de ácidos grasos libres biológicamente activos como el ácido araquidónico (Juurlink & Sweeney, 1997), la inducción de estrés en el retículo endoplásmico, la inducción del desajuste mitocondrial, la fragmentación del DNA, la pérdida de la integridad del citoesqueleto y la inhibición de transportadores de glutamato. La inducción de estrés del retículo endoplásmico puede inducir apoptosis e incrementar las vías de daño molecular relacionadas con la disfunción mitocondrial (Arango-Davila et al., 2004; Hossmann, 2006), gracias a la activación directa que ejercen sobre las caspasas (Dirnagl et al., 1999; Doyle et al., 2008).

Inflamación

Durante el transcurso de horas a días posteriores al inicio de la isquemia se presenta una respuesta inflamatoria; que es un proceso compuesto que involucra diferentes tipos de células como los mediadores inflamatorios y los receptores extracelulares (Castillo, 2000). Se considera que la respuesta inflamatoria contribuye a la progresión del daño isquémico cerebral, ya que se asocia a la generación de radicales libres en el tejido reperfundido o críticamente hipoperfundido (Doyle et al., 2008; Hossmann, 2006). El mecanismo que desencadena esta respuesta es la liberación de citocinas, particularmente la interleucina (IL)-1 y la IL-6, así como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que se da por la activación de las células endoteliales, las neuronas, los astrocitos y la microglía. Algunos de los efectos dañinos de las ILs son fiebre, liberación de ácido araquidónico, incremento de la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA y la estimulación de la síntesis de NO (Doyle et al., 2008).

Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es una forma activa de muerte celular esencial para la homeostasis tisular (Culmsee & Krieglstein, 2005). Durante la isquemia cerebral, las células del cerebro comprometidas por la excesiva activación de los receptores glutamatérgicos, la sobrecarga de Ca^{2+} , la producción de radicales libres o por el daño mitocondrial o del DNA pueden morir por apoptosis pues son incapaces de sobrevivir en un ambiente metabólicamente alterado (Macaya et al., 1996; Onténiente & cols., 2003). Por ejemplo, reducciones moderadas de ATP mitocondrial originan la activación de caspasas, la liberación de citocromo *c* y de un factor de inducción de la apoptosis, que en conjunto actúan como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica (Castillo et al., 2003). Las caspasas son enzimas que modifican la homeostasis y reparan proteínas, que a su vez, destruyen la estructura celular; se sabe que éstas se activan cuando el citocromo *c* es liberado en la mitocondria (Dirnagl et al., 1999; Doyle et al., 2008). La liberación del citocromo *c* es causada por el desajuste iónico y la hinchazón mitocondrial o por la formación de poros en la membrana mitocondrial externa (Doyle et al., 2008). Además de la expresión de los genes que activan las caspasas, los genes que incrementan o inhiben la muerte celular son activados y expresados en altos niveles, tanto en estadios tardíos como tempranos de la isquemia, lo que finalmente lleva a la muerte celular (Macaya et al., 1996).

1.2 Vasculatura normal del Sistema Nervioso Central

La irrigación sanguínea cerebral depende de dos sistemas de circulación que reciben sangre de diferentes arterias sistémicas: el sistema de circulación anterior o carotídeo, que es alimentado por las carótidas internas, y el sistema de circulación posterior o vertebrobasilar, que recibe sangre de las arterias vertebrales (Fig. 4). En la cara inferior del cerebro ambos sistemas forman el polígono de Willis, que funciona como sistema de circulación colateral en caso de que se presente alguna falla en la irrigación sanguínea, al conectarse las dos arterias cerebrales anteriores mediante la arteria comunicante anterior; las arterias cerebrales posteriores lo hacen con las arterias carótidas internas mediante las arterias comunicantes posteriores (Kandel et al., 2000; Martin, 1989; Scremin, 2004). Esta interconexión es importante pues funciona como un sistema de compensación cuando alguno de los sistemas no es funcional. Aunque ambos sistemas arteriales distribuyen cada

una de sus ramas en áreas específicas del cerebro (Kandel et al., 2000; Martin, 1989; Pébet, 2002), es importante señalar que no son independientes, ya que la circulación anterior y posterior está interconectada por una red de arterias de la superficie cortical y las arterias comunicantes en la superficie ventral del diencefalo. Mientras los hemisferios cerebrales reciben sangre tanto de la circulación anterior como posterior, el tronco del cerebro la recibe de la circulación posterior (Martin, 1989).

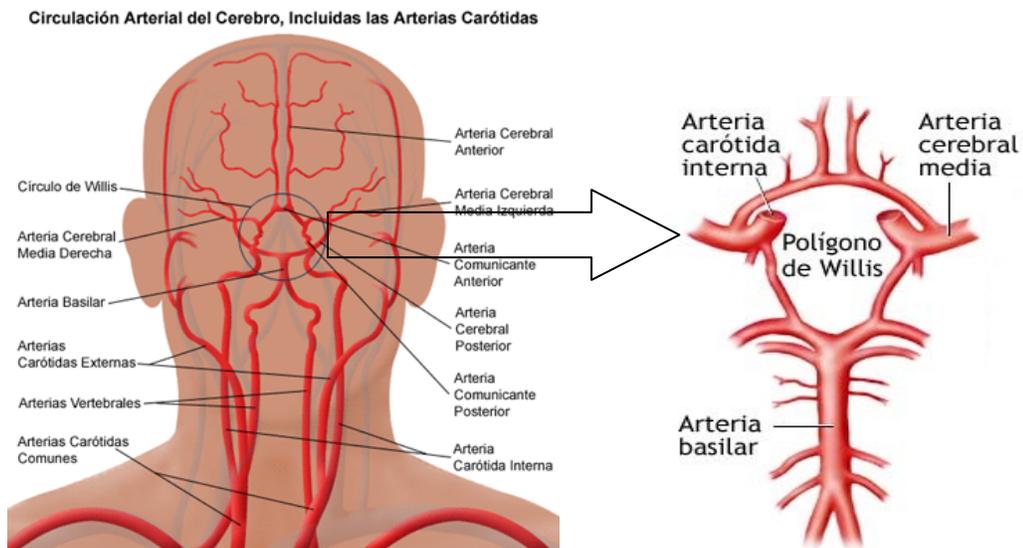


Fig. 4. Sistemas de irrigación sanguínea. Se muestran el sistema carotídeo y basilar, además del polígono de Willis.

1.2.1 Sistema carotídeo

Este sistema está formado por las arterias carótidas internas cuyas ramas principales son la *arteria oftálmica*, la *arteria comunicante posterior* (que forma parte del polígono de Willis) y la *arteria coroidal anterior*. Estas ramas se encargan de irrigar estructuras cerebrales y craneales, los nervios ópticos y la retina, la porción anterior de cada hemisferio que abarca los lóbulos frontal, parietal y la parte anterior del lóbulo temporal, el diencefalo, los ganglios basales y la cápsula interna (Futrell & Millikan, 1996; Kandel et al., 2000; Martin, 1989; Pébet, 2002; Scremin, 2004).

1.2.2 Sistema vertebrobasilar

El sistema vertebrobasilar está constituido por las arterias vertebral y basilar cuyas ramas se dividen en tres grupos: 1) ramas paramedianas, entre ellas la *arteria espinal anterior*, que irriga estructuras de la línea media; 2) ramas circunferenciales cortas, que

irrigan estructuras más laterales como los pedúnculos cerebelosos inferior, medio y superior; y 3) ramas circunferenciales largas como las *arterias cerebelosas inferoposterior, inferoanterior, media y superior*, que también irrigan estructuras laterales del tronco del encéfalo y los pedúnculos cerebelosos, así como al propio cerebelo (Kandel et al., 2000). Las arterias vertebrales dan origen a las ramas espinal posterior, anterior y cerebelosa-posteroinferior que irrigan parte del cerebelo, la médula oblongada, el bulbo raquídeo y la médula espinal. En la porción basilar, formada por la unión de las dos arterias vertebrales, las arterias cerebrales posteriores suministran sangre a la superficie inferior del lóbulo temporal y la superficie medial e inferior del lóbulo occipital (Martin, 1989; Scremin, 2004).

Cuando alguno de estos dos sistemas o sus ramas son bloqueados por un émbolo se produce la pérdida de las funciones de las áreas cerebrales irrigadas; como compensación, a través del polígono de Willis, puede haber circulación colateral para rescatar a la región privada de flujo sanguíneo (Futrell & Millikan, 1996). A pesar del alto porcentaje de ocurrencia de un evento isquémico en el sistema de circulación carotídeo (80-85%), los efectos neurológicos dependerán del área cerebral afectada, la severidad y la duración del déficit sanguíneo, así como de los procesos plásticos reparadores (Futrell & Millikan, 1996; Kandel et al., 2000).

1.3 Consecuencias clínicas de la isquemia cerebral

Generalmente, se presenta una gran variedad de alteraciones sensoriales y motoras que incluyen temblor, pérdida de la coordinación muscular y parálisis parciales, así como falla en la integración sensorial, *síncope, apraxia, negligencia unilateral* y problemas de visión como *hemianopsia homónima, amaurosis fugaz* o *diplopía* y *disfagia* (véase apartado 7.1; Baumlin & Richardson, 1997; Caplan & Hon, 2004; de Vries et al., 2001; Ng, Stein, Ning, & Black-Schaffer, 2007). También se puede presentar disfunción cortical superior que se manifiesta como amnesia, demencia y delirio, además de trastornos del lenguaje y problemas en el habla como afasia o *disartria* que conllevan a una limitación en las habilidades necesarias para escuchar, leer y escribir (Grubb et al., 2000; Patel, Coshall, Rudd, & Wolfe, 2003; Rogers, Campbell, Stretton, & Mackay, 1997; Tatemichi et al., 1994). Como consecuencia del infarto se observa una amplia variedad de manifestaciones, que van desde aquellas reversibles como las hemiplejías hasta las irreversibles que incluyen déficits

sensoriales o cognitivos, entre los que se incluyen reducción en la capacidad intelectual, daño en orientación espacial y memoria semántica (Block, 1999; Corbett & Nurse, 1998). Las manifestaciones clínicas de la isquemia cerebral aguda dependen de la localización, severidad y duración del déficit de perfusión (Bradberry & Phrarm, 1993). Las estadísticas señalan que un 25% de los pacientes con EVC aguda muere el primer mes y un 50% de los sobrevivientes queda física y mentalmente discapacitados (American Stroke Association, 2008; Durukan, Strbian, & Tatlisumak, 2008). En estos pacientes, cerca del 65% de ellos tiene un diagnóstico de depresión postisquémica el primer año posterior al evento isquémico. Se considera que la depresión postisquémica está asociada al incremento en el déficit cognitivo, decremento general en la interacción social y decremento en la motivación y función sexual (de Vries et al., 2001) que, finalmente, obstaculizan la reintegración del paciente a su vida previa (Bradberry & Phrarm, 1993).

1.3.1 Alteraciones en aprendizaje y memoria inducidas por isquemia cerebral aguda

La evaluación del desempeño de los animales isquémicos en tareas como el laberinto acuático de Morris (MWM, por sus siglas en inglés), el laberinto radial (RAM) o el laberinto en T demuestra que la isquemia produce déficits en memoria de trabajo y memoria de referencia, que con el tiempo muestran recuperación sustancial de la función de ambos tipos de memoria. Por ejemplo, en el MWM el déficit en memoria se observa al incrementar la latencia para encontrar la plataforma (Auer, Jensen, & Wishaw, 1989); sin embargo, algunos autores proponen que el déficit se observa en aprendizaje espacial más que en memoria espacial (Modo et al., 2000). En el caso del RAM, la ejecución de la tarea poco después de la inducción de isquemia cerebral es pobre, ya que el número de errores en memoria de trabajo incrementa (Block, 1999; Corbett & Nurse, 1998). Cabe mencionar que los déficits en memoria de trabajo pueden ser más persistentes después de la isquemia global (de Vries et al., 2001). Es importante señalar que estos resultados podrían estar alterados por la alteración subyacente en el patrón alimenticio de los sujetos, ya que su alimentación se vuelve irregular después de la inducción de un evento isquémico (Corbett & Nurse, 1998). Existe evidencia experimental que señala una rápida recuperación durante la primera semana posterior a la oclusión arterial por 5 min (isquemia leve); pero si la isquemia es

severa (20 min de oclusión), los déficits resultantes pueden persistir al menos por un mes (Corbett & Nurse, 1998). Finalmente, en el laberinto en T, el déficit producido se sitúa en la ejecución inadecuada del segundo ensayo, ya que el sujeto experimental es incapaz de alternar, aun cuando se inserten intervalos de demora en la tarea (Dudchenko, 2004; Gerlai, 1996). Al emplear los modelos experimentales de isquemia como la oclusión de 4 vasos (4VO) y la oclusión de 2 vasos (2VO), los resultados indican que en el caso del primer modelo, el déficit puede persistir hasta por un período de 4 meses; para el segundo modelo, se detectó la existencia de déficit en el aprendizaje que puede persistir al menos por un mes, de hecho, los animales isquémicos tuvieron problemas al aprender una nueva tarea después de la inducción de un evento isquémico (Hunter, Mackay et al., 1998).

1.4 Modelos experimentales en isquemia cerebral aguda

Actualmente, el conocimiento sobre el daño neuronal durante y después de la isquemia cerebral está basado en modelos animales de isquemia cerebral (Juurlink & Sweeney, 1997; Dirnagl et al., 1999; Lipton, 1999; Onténiente & cols., 2003). El objetivo de los modelos experimentales es adquirir conocimiento sobre la patofisiología del daño cerebral isquémico y el efecto de fármacos capaces de minimizar dicho daño, principal interés dentro del área clínica. Los modelos experimentales desarrollados, que usualmente emplean roedores (jerbos, ratas, ratones), se pueden agrupar en dos grandes categorías: modelos de isquemia focal y modelos de isquemia global. La oclusión de una arteria específica da como resultado la isquemia focal, habitualmente de la arteria cerebral media (MCA). La oclusión puede ser permanente o transitoria (remoción del bloqueo para permitir la reperusión; Green et al., 2003; Hunter, Green, & Cross, 1995). En los modelos de isquemia global, generalmente del cerebro anterior, el bloqueo transitorio (5-30 min) de las arterias carótidas comunes afecta áreas cerebrales muy extensas (Block, 1999; Hunter, Green et al., 1995; Rodríguez, Santiago-Mejía, Fuentes-Vargas, & Ramírez-San Juan, 2003; Traystman, 2003). La principal característica de los modelos de isquemia global es que mantienen el flujo sanguíneo del tallo cerebral, permitiendo a los animales la capacidad de ventilar espontáneamente. Aunque existen muchas maneras de interrumpir el flujo sanguíneo al cerebro anterior, la mayoría de los modelos incluye la oclusión de las arterias carótidas comunes en sus protocolos. En los estudios más recientes (Hossmann, 2008; Small &

Buchan, 2000) se da preferencia al uso de ratones, ya que en éstos se observan diferencias en el sistema de irrigación sanguínea como presencia o ausencia de la arteria comunicante posterior. La ausencia de esta arteria permite que la oclusión de las arterias carótidas comunes produzca menos del 23% de microperfusión cortical basal. Algunos de los modelos de isquemia global son la oclusión de dos vasos con y sin hipotensión (2VO+ hypo; 2VO) y la oclusión de cuatro vasos (4VO; Hossmann, 2008; Pulsinelli, Brierly, & Blum, 1982).

1.5 Modelo de sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC)

Los modelos experimentales de isquemia cerebral se han enfocado en el tratamiento neuroprotector con el fin de evitar la muerte neuronal del tejido que forma parte de la zona de penumbra isquémica. Sin embargo, alrededor de ellos se ha generado un gran número de críticas relacionadas con las consideraciones metodológicas, lo que permitió el planteamiento de modelos capaces de reproducir el evento a nivel clínico. Tomando en cuenta estas consideraciones, el grupo de trabajo de Rodriguez, Rodriguez-Boscan et al. (2000) desarrolló el modelo de sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC). La SSACC es un modelo de isquemia cerebral incompleta ya que la interrupción de la circulación sanguínea producida afecta únicamente al sistema carotídeo, dejando intacta la circulación del sistema vertebrobasilar encargado de irrigar a los centros cerebrales reguladores de funciones vitales como la respiratoria y la cardiovascular. Este procedimiento se lleva a cabo en dos etapas; en la primera, se liga y secciona la arteria carótida común izquierda; en la segunda, 32 días después, se realiza el mismo procedimiento con la arteria contralateral.

1.5.1 Características del modelo

Las diferencias básicas de este modelo con respecto a los modelos tradicionales de isquemia cerebral son: 1) el empleo de animales envejecidos (40 a 60 semanas de edad), lo cual los vuelve más vulnerables de daño isquémico (Fuentes-Vargas, Santiago-Mejía, Pinzón, & Rodriguez, 2002) y, 2) el intervalo temporal (32 días) entre la oclusión de una y otra arteria, posibilitando la generación de un estado crónico de hipoperfusión cerebral, simulando lo que ocurre con algunos de los pacientes con EVC que presentan ataques isquémicos transitorios previos a un evento isquémico mayor. Es importante señalar que la sección de la arteria carótida izquierda produce aumento paulatino en el diámetro de las

arterias que conforman el polígono de Willis, así como la generación de nuevos vasos (vasogénesis), lo que compensa la disminución del flujo sanguíneo (Kandel et al., 2000, Rodríguez, Rodríguez-Boscan et al., 2000). Esta última característica prolonga el tiempo de vida de los animales, facilitando el estudio de alteraciones conductuales y cognitivas, además del empleo de fármacos que modifiquen dichas alteraciones (Rodríguez, Santiago-Mejía, Gómez, & Ramírez, 2005), como lo realizaron en el 2003 Rodríguez, Santiago-Mejía, Fuentes-Vargas, & Ramírez, demostrando que el dexrazoxano posee propiedades neuroprotectoras.

1.5.2 Alteraciones conductuales inducidas por SSACC

Los estudios enfocados en la identificación y caracterización de las alteraciones neuroconductuales inducidas por la isquemia cerebral aguda tienen como objetivo evaluar el papel de fármacos neuroprotectores. Los resultados obtenidos al administrar diferentes fármacos en modelos experimentales son alentadores; sin embargo, al trasladar su empleo a la clínica se observa poca efectividad en el tratamiento de la isquemia cerebral (de Keyser, Sulter, & Luiten, 1999; de Vries et al., 2001; Green et al., 2003; Wahlgren & Ahmed, 2004). En el caso de la isquemia cerebral aguda inducida por la SSACC el interés no es diferente, por lo que se inició una línea de investigación cuyo objetivo principal fue identificar la presencia y severidad de las alteraciones neurológicas que se presentan tras la sección de las arterias carótidas comunes, para lo cual se empleó una escala que determina distintos niveles de disfunción. Los resultados mostraron la presencia de 10 alteraciones consistentes y bien definidas como incoordinación motora, posición corporal anormal (lateralizada), hipomotilidad, disminución del tono y la fuerza muscular, temblor, encorvamiento, flexión de la extremidad anterior y marcha atáxica (Fuentes-Vargas et al., 2002; Rodríguez, Gerson, & Santiago-Mejía, 2000; Rodríguez, Santiago-Mejía, Gómez et al., 2005; Rodríguez, Rodríguez-Boscan et al., 2000); además de hemiparesis o hemiplejía (Gómez, Santiago-Mejía, Ventura-Martínez, & Rodríguez, 2006).

A diferencia de otros modelos que inducen isquemia cerebral, la SSACC presenta dos ventajas. Por un lado, el patrón de alteraciones es reproducible; por otra parte, el síndrome producido por la SSACC genera un amplio rango de alteraciones neuroconductuales que permiten evaluar el impacto funcional de la isquemia cerebral aguda, así como la posible

recuperación de los sujetos tras la administración de fármacos neuroprotectores (Rodríguez, Santiago-Mejía, Fuentes-Vargas et al., 2003; Santiago-Mejía et al., 2004). Considerando estas ventajas, se llevaron a cabo diferentes estudios para identificar, evaluar y determinar cuáles son las alteraciones neuroconductuales más importantes inducidas por la sección de las arterias carótidas comunes y la eficacia de fármacos neuroprotectores.

El primer trabajo realizado se enfocó en la caracterización de las alteraciones en la actividad locomotora, tanto exploratoria como espontánea, y la evaluación del efecto de los antioxidantes sobre el índice de mortalidad y las alteraciones neuroconductuales inducidas por la SSACC. Los resultados señalan que los animales bajo tratamiento farmacológico mostraron un aumento en la actividad locomotora, comparados con los animales administrados con solución salina (Santiago-Mejía et al., 2004). 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 la SSACC se procedió a evaluar la capacidad de los animales isquémicos para manipular, abrir y consumir una semilla de girasol. Los resultados mostraron que los animales isquémicos presentan alteraciones motoras finas (en patas anteriores y falanges) que les impiden sostener y manipular la semilla de girasol, incrementando el tiempo en el que los animales se acercaron a la semilla (Gómez et al., 2006).

1.6 Estrategias experimentales para el estudio de aprendizaje y memoria

Para que puedan desplazarse por su hábitat de manera eficaz, los animales deben aprender y recordar la distribución de su medio; por ejemplo, dónde se localizan los espacios abiertos, las áreas de refugio, las fuentes potenciales de alimento, la ubicación del nido, el alimento almacenado y los depredadores (Cabrera, 2009; Domjan, 2003; Olton & Samuelson, 1976). Para los organismos es importante recordar lo anterior porque no todos los lugares de un espacio son homogéneos en términos de distribución de probabilidad de la conducta en dichos lugares. El aprendizaje es considerado un proceso que ayuda y facilita la adaptación de muchas especies a su ambiente, se puede definir como un cambio perdurable en las respuestas a una situación particular como resultado de la experiencia anterior con esa clase de situación. Gran parte del trabajo de investigación realizado en el área se ha enfocado al descubrimiento de las reglas generales que describan cómo modifican los animales su

conducta a partir de su interacción con el ambiente, cómo almacenan información y cómo ésta guía, posteriormente, su conducta. El estudio de las relaciones existentes entre la conducta y sus consecuencias se realiza mediante procedimientos experimentales como el condicionamiento clásico u operante (Domjan, 2003). Para solucionar exitosamente los paradigmas experimentales, los sujetos deben emplear mecanismos de memoria que les permitan recordar cuáles son las reglas generales y específicas de la tarea que los llevarán a obtener o evitar estímulos agradables o nocivos, respectivamente. Por ejemplo, en un laberinto radial los sujetos deben aprender cuáles son los brazos que se encuentran reforzados y recordar cuáles son los brazos que ya visitaron para obtener el mayor número de reforzadores posible, empleando para ello, memoria espacial y de corto plazo (Domjan, 2003; Dudchenko, 2004; Olton & Samuelson, 1976).

Los experimentos de aprendizaje y memoria comparten ciertas características dentro de la codificación de información. La primera característica es la exposición de los organismos a cierto tipo de información, esta fase se conoce como adquisición. Posteriormente, la información adquirida se retiene por cierto tiempo –intervalo de retención; al cabo de dicho intervalo, se evalúa el recuerdo que los sujetos tienen de la experiencia original, lo que implica recuperación o reactivación de la información encontrada durante la adquisición. Por lo tanto, las fases implicadas son básicamente tres: adquisición, retención y recuperación. A pesar de encontrar estas fases en ambos estudios, la diferencia radica en la sucesión temporal de cada evento. En los estudios de aprendizaje, la atención se centra en la fase de adquisición al abordar el tipo de información que se adquiere mediante la manipulación de las condiciones de adquisición. En relación al intervalo de retención, este puede ser de un día o más; generalmente los intervalos de retención no varían durante los experimentos.

En contraste, los trabajos que evalúan memoria se centran en las fases de retención y recuperación de la información adquirida. Los aspectos relacionados con la adquisición son de interés solo en la medida en que resultan significativos para la retención y la recuperación. A menudo el intervalo de retención varía para determinar cómo se modifica la disponibilidad de la información adquirida a lo largo del tiempo; los intervalos de retención empleados pueden ser de cualquier duración. De hecho, muchos estudios emplean intervalos de retención breves. Para la fase de recuperación, lo que se modifica son los escenarios en los

cuales se debe recuperar la información almacenada. Sin embargo, se debe tener en cuenta que cualquier evento simple es parte de un flujo continuo de eventos, por lo que la memoria para algún evento particular está influenciada por los sucesos que la rodean y que pueden alterar el recuerdo de ese evento (Domjan, 2003; Wright, 2007).

La clasificación de los mecanismos de memoria se realiza en función de lo que se recuerda, i. e., los contenidos de la memoria y el tiempo que se recuerda o intervalo de retención. Una de estas clasificaciones distingue la memoria de trabajo de la memoria de referencia (Domjan, 2003; Dudchenko, 2004; Roberts, 1998). La memoria de trabajo se puede definir como la memoria a corto plazo para un objeto, estímulo o ubicación, este tipo de memoria es empleada por los organismos dentro de una sesión experimental, ya que integra los aspectos transitorios y cambiantes en el ambiente, dado que estos aspectos controlan la conducta momento a momento dentro del ensayo, pierden efecto al término del mismo. Este tipo de memoria suele ser de corta duración, desde algunos segundos hasta horas e incluso días (Cabrera, 2009; Domjan, 2003; Dudchenko, 2004; Roberts, 1998). La memoria de referencia en cambio, se adquiere mediante ensayos repetidos y puede persistir algunas horas, días o varios meses, debido a que las propiedades fijas de la estructura ambiental controlan la conducta consistentemente a través de los ensayos. Se considera que la memoria de referencia es un tipo de memoria para las reglas de una tarea específica, mientras que la memoria de trabajo se atribuye a la representación dependiente de la demora de los estímulos usados para guiar la conducta dentro de una tarea (Dudchenko, 2004); es decir, la memoria de trabajo contiene un componente temporal y flexible en función de la asociación estímulo-respuesta, dependiente de la utilidad de la información y la saliencia del estímulo a recordar (Honig, 1978, citado en Roberts, 1998). En términos generales, la memoria de referencia incluye todas las asociaciones que un organismo adquiere sobre su conducta, su entorno y las relaciones entre su conducta y el ambiente (Domjan, 2003; Dudchenko, 2004; Roberts, 1998). Las tareas comúnmente empleadas en el estudio de la memoria consideran la forma en que los animales recuerdan una serie de sucesos diferentes; están basadas en estrategias de forrajeo específicas de las especies e ilustran algunas especialidades adaptativas a destacar de la memoria de trabajo para estímulos espaciales; por ejemplo, en laberintos. El uso de laberintos aprovecha la tendencia natural de los roedores de explorar espacios cerrados y pequeños, así como la evitación de

espacios abiertos y elevados (Montgomery, 1958, citado en Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985; Sharma & Kulkarni, 1992). Cabe mencionar que los animales generalmente empleados en este tipo de tareas son roedores, particularmente ratas o ratones.

A partir del trabajo realizado por Small en 1901 (citado en Dudchenko, 2004), las primeras tareas intentaron encontrar cuáles son las señales sensoriales que emplean los animales para resolver una tarea o la capacidad de recordar una ubicación o grupos de ubicaciones, así como la aproximación o evitación subsecuente de éstas. Los tareas frecuentemente empleadas para el estudio de la memoria son el laberinto acuático de Morris (MWM; 1984), el laberinto radial (Olton & Samuelson, 1976; Olton 1987), el laberinto en T (Tolman, 1925; citado en Dudchenko, 2004) y el paradigma de no igualación demorada a la muestra (Hunter, 1913; citado en Dudchenko, 2004). En seguida, se brinda una breve descripción de estos paradigmas y algunas de las variantes disponibles de cada una de ellas, además del componente de memoria evaluado.

1.6.1 Laberinto acuático de Morris (MWM)

Esta tarea se desarrolló con el objetivo de medir la habilidad de las ratas de aprender, recordar y dirigirse a un lugar en el espacio, definido únicamente por su posición relativa a las señales distales extralaberínticas. Mediante esta tarea se puede medir memoria de trabajo y memoria de referencia. El laberinto es una alberca circular que contiene agua opaca que cubre una plataforma (Morris, 1984). El procedimiento estándar consiste en colocar la plataforma sumergida en la misma ubicación dentro la alberca durante el experimento, la tarea se resuelve una vez que la rata ha aprendido la relación espacial entre la ubicación de la plataforma y las señales extralaberínticas presentes en el cuarto experimental. Esta versión de la tarea permite evaluar memoria de referencia; es posible evaluar memoria de trabajo si cada día se modifica la posición de la plataforma dentro de la alberca (Block, 1999; Corbett & Nurse, 1998; de Vries et al., 2002; Dudchenko, 2004).

1.6.2 Laberinto radial (RAM)

El laberinto radial (RAM) consta de ocho brazos que irradian de una plataforma central que facilita el acceso a los brazos. Alrededor de la plataforma, en la entrada de cada uno de los brazos se encuentra una puerta guillotina que se levanta, para permitir a la rata ingresar

al brazo, o baja, para evitar que la rata ingrese a ese brazo. También contiene una barrera entre los brazos cerca de la plataforma central que evita a la rata saltar de un brazo a otro, forzándola a ir hacia la plataforma central antes de elegir otra opción. Antes de cada sesión se coloca un pellet al final de cada brazo, se sitúa a la rata en el centro del laberinto con las puertas guillotina cerradas, entonces, se levantan todas las puertas; la rata elige un brazo y corre hacia el final de este para comer la comida. Las puertas de los brazos restantes se cierran, la rata vuelve al centro y la puerta del brazo visitado se baja, dejando a la rata en la plataforma central nuevamente, después de un intervalo de demora se levantan nuevamente todas las puertas. Este procedimiento se repite hasta que los sujetos logran algún criterio (Domjan, 2003; Olton & Samuelson, 1976; Olton, 1987). El objetivo de esta tarea es medir la habilidad de las ratas de recordar una lista de ubicaciones espaciales. Además de evaluar memoria espacial también se puede medir memoria de trabajo (Block, 1999). Una de las modificaciones realizadas para evaluar memoria de trabajo es la introducción de un período de demora después del tercer ensayo; los intervalos de demora pueden variar desde 1 min hasta 120 min. Otra modificación, es la ubicación del reforzador en algunos de los brazos. Cabe mencionar que es posible ejecutar una adaptación de la tarea de igualación a la muestra en el laberinto radial, es decir, se permite a la rata visitar uno de los brazos donde se le entregará el reforzador, posteriormente, se vuelve a colocar a la rata en el centro del laberinto cerrando el acceso al resto de los brazos, después de una demora breve la rata debe ingresar al brazo donde obtuvo el reforzador (Jarrard, 1983, citado en Dudchenko, 2004).

1.6.3 Laberinto en T

En este paradigma experimental se evalúa a los animales en pares de ensayos en los que la información reunida durante el primer ensayo debe ser recordada para tener éxito en el segundo ensayo, aprovechando la tendencia natural de las ratas de elegir brazos alternativos del laberinto o ubicaciones al ser expuestas nuevamente a éste. Se considera que el primero en trabajar este paradigma fue Tolman (1925; citado en Dudchenko, 2004) quien describió la pronunciada tendencia de las ratas de alternar en el laberinto en ensayos repetidos. En la mayoría de las versiones se coloca a la rata en la base de la T por donde debe correr hasta ingresar a alguno de los brazos del laberinto (primer ensayo) donde

recibirá un reforzador. Tras su ingreso, se coloca nuevamente al sujeto en la base del laberinto para realizar el segundo ensayo, en el que debe alternar la respuesta, es decir, aunque ambos brazos del laberinto son accesibles, la rata obtiene el reforzador sólo si ingresa al brazo opuesto (Corbett & Nurse, 1998; Dudchenko, 2004; Gerlai, 1996). Este procedimiento permite evaluar memoria de trabajo. Si se agrega un intervalo de demora entre cada ensayo, el paradigma se conoce como alternación demorada. Aunque el laberinto en T es el modelo más empleado en tareas de alternación, el laberinto elevado en cruz ha mostrado ser un modelo eficiente en la evaluación de alternación espontánea (Lennartz, 2008).

1.6.4 No igualación demorada a la muestra (DNMS) con olores u objetos

En las tareas de no igualación demorada a la muestra el sujeto debe recordar el estímulo a través de una demora en la cual, el estímulo no está presente. Posterior a la demora, se le presenta al sujeto el estímulo previo y un estímulo alterno, se refuerza al sujeto si emite la respuesta hacia el estímulo alterno. Esta tarea la pueden ejecutar palomas en cámaras experimentales con luces y ratas con objetos (Ennaceur & Delacour, 1988; donde se mide exploración espontánea; Rothblat & Hayes, 1987) u olores (Dudchenko, 2000; Otto & Eichenbaum, 1992) o en cajas experimentales (Pontecorvo, 1983).

1.7 Modelo de laberinto elevado en cruz (EPM)

El laberinto elevado en cruz (EPM) es una estructura formada por dos brazos abiertos y dos brazos cerrados que se intersectan en el centro formando una cruz; habitualmente se coloca sobre una plataforma para elevarlo del suelo. En general, dentro de las características del laberinto se encuentra la incorporación de elementos de desconocimiento, apertura y elevación de espacios (Sison & Gerlai, 2010), aprovechando la tendencia natural de los roedores de evitar espacios elevados y abiertos (Lister, 1987; Pellow et al., 1985).

Sin duda desde su descripción y validación en ratas y ratones (Handley & Mitani, 1984; Lister, 1987; Pellow et al., 1985), el EPM es una de las herramientas más extensamente empleadas para evaluar el efecto de fármacos ansiolíticos y ansiogénicos (Handley & Mithani, 1984; Lister, 1987; Pellow et al., 1985; Sharma & Kulkarni, 1992; Silva & Frussa-Filho, 2000); se sabe que estos fármacos incrementan y decrementan (Lister, 1987;

Pellow et al., 1985; Sharma & Kulkarni, 1992) el porcentaje de tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos, así como el porcentaje de entradas realizadas en los mismos, respectivamente. A partir del trabajo realizado en 1990 por Itoh, Nabeshima, & Kameyama, el EPM se ha utilizado para evaluar memoria (Rodgers et al., 1996; Lamprea, Cardenas, Silveira, Morato, & Walsh, 2000; Silva & Frussa-Filho, 2000; Sharma & Kulkarni, 1992). Estos autores proponen que el decremento registrado en el tiempo que tarda el sujeto en trasladarse de un brazo abierto a uno cerrado (latencia de transferencia, TL) durante la fase de re-evaluación podría ser una medida de memoria (Sharma & Kulkarni, 1992). Desde entonces, otros autores han sugerido algunos paradigmas experimentales con el objetivo de evaluar procesos cognitivos como aprendizaje y memoria. Por ejemplo, el paradigma de evitación inhibitoria (Frussa-Filho, Otoboni, Uema, & Sá-Rocha, 1991; Silva & Frussa-Filho, 2000; Sison & Gerlai, 2010) permite evaluar memoria y aprendizaje asociativo (Sison & Gerlai, 2010). Al evaluar el efecto de las señales extralaberínticas sobre alternación espontánea (Lennartz, 2008) se abre la posibilidad de estudiar aprendizaje espacial.

1.8 Fármacos neuroprotectores

Uno de los principales abordajes a nivel clínico y experimental, es el estudio del efecto de fármacos que intervienen en la cascada bioquímica de daño isquémico. Particularmente, se enfocan en la protección celular temprana para mantener el flujo sanguíneo cerebral en niveles adecuados y así, satisfacer la demanda metabólica, interrumpiendo alguno de los niveles de la compleja cascada de eventos que se inician durante la isquemia y conllevan a la muerte neuronal. En la clínica, además de buscar incrementar la sobrevivencia de los pacientes se espera mejorar su calidad de vida.

La neuroprotección, es la preservación de la integridad funcional y estructural del cerebro por cualquier tipo de intervención para detener los efectos perjudiciales de la isquemia. En general, el término se refiere a aquellos fármacos que protegen al cerebro del daño neuronal una vez que se ha presentado un infarto evitando la muerte neuronal, favoreciendo la preservación temporal de la zona de penumbra al acortar el tiempo entre el inicio del evento isquémico y la restauración del flujo sanguíneo y/o previniendo la muerte neuronal secundaria a la reperfusión. Las intervenciones neuroprotectoras están mediadas no sólo por su interferencia en la cascada bioquímica de daño isquémico sino también por la

reducción del desajuste entre el flujo sanguíneo y el metabolismo. El supuesto es que el núcleo del área dañada (zona de infarto) no se salvará; sin embargo, el tejido circundante al núcleo (penumbra), a pesar de estar comprometido con niveles de flujo sanguíneo bajos, se puede salvar, ya sea por reperfusión o por la administración de fármacos neuroprotectores. La evidencia experimental señala que el tejido no tratado puede llegar a formar parte de la zona de infarto (Arango-Davila et al., 2004; Back & cols., 2004, Belayev et al., 1997). Entre los resultados se espera que este tipo de fármacos atenúe algunas de las causas subyacentes al infarto, incluyendo la incapacidad motriz y la hemi-negligencia espacial. Sin embargo, la mayoría de los neuroprotectores muestra eficacia únicamente en los modelos animales, sin que hasta el momento se señale algún tratamiento como eficaz, ya que no se observan resultados benéficos en los pacientes con isquemia cerebral aguda, ya sea por presencia de efectos adversos graves o por su estrecha ventana terapéutica de administración (Green et al., 2003; Hossmann, 2006; Wahlgren & Ahmed, 2004). Por ejemplo, los antioxidantes, moléculas que impiden procesos oxidativos consecuencia de la formación excesiva de radicales libres, a nivel experimental resultan eficaces en la reducción del tamaño del infarto pero al realizar ensayos clínicos, los resultados obtenidos no son muy alentadores, debido al poco o nulo efecto neuroprotector que algunos de ellos tienen o por las altas dosis necesarias y poco toleradas por los pacientes (Santiago-Mejía et al., 2004; Wahlgren & Ahmed, 2004).

Actualmente, la única terapia aprobada para el tratamiento de la isquemia cerebral es la administración del activador tisular del plasminógeno (tPA), que es un agente trombolítico (Cheng, Al-Khoury, & Zivin, 2004; Durukan et al., 2008). Su mecanismo de acción es la recanalización del vaso obstruido para restablecer el flujo cerebral; sin embargo, para obtener resultados eficaces, debe administrarse dentro de las 3h posteriores al evento isquémico. La principal desventaja, además de su estrecha ventana terapéutica, es el riesgo de sufrir una hemorragia cerebral, principalmente en aquellos pacientes que reciben tratamiento posterior a las 3h del inicio del evento isquémico (Culmsee & Krieglstein, 2005; Durukan et al., 2008; Wahlgren & Ahmed, 2004). Uno de los fármacos utilizados como cardioprotector en animales y humanos es el dexrazoxano; se trata de un quelante de metales empleado en la terapéutica para reducir la cardiotoxicidad causada por las antraciclinas, agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer, tales como la

doxorubicina, permitiendo el uso de altas dosis de éstas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Se sabe que los efectos adversos de las antraciclinas, caracterizados por necrosis del cardiomiocito, que conlleva a fallas cardíacas congestivas, son resultado de la formación de radicales libres metal-dependientes de oxígeno por los complejos metálicos de éstas (Weiss, Loyevsky, & Gordeuk, 1999). En ausencia de sistemas adecuados de neutralización de radicales libres en el corazón, ocurre daño en la mitocondria miocárdial debido a la lipoperoxidación de la membrana. Estos efectos son prevenidos por el dexrazoxano a través de la quelación de iones férricos libres o unidos a las antraciclinas, gracias a los anillos abiertos de los metabolitos del fármaco que se adhieren a los compuestos férricos en el interior de la célula (Vidrio, Carrasco, & Rodríguez, 2006). Estudios previos (Rodríguez, Rodríguez-Boscan et al., 2000; Rodríguez, Santiago-Mejía, Fuentes-Vargas et al., 2003) muestran que el dexrazoxano ejerce un efecto neuroprotector en ratones sujetos a isquemia global cerebral, al observarse una disminución del índice de mortalidad y déficit neurológico en los animales (hipomotilidad e incoordinación motora) inducidos por la sección de las carótidas. Considerando los resultados obtenidos en modelos animales y su aplicación en la terapéutica, en el presente trabajo se utilizó este fármaco para evaluar su efecto neuroprotector, es decir, en la reducción del infarto así como su efecto en las alteraciones inducidas por isquemia cerebral en aprendizaje y memoria empleando el laberinto elevado en cruz.

II. MÉTODO

2.1 Justificación

Tanto la identificación como la caracterización de las consecuencias del daño isquémico resultan difíciles de modelar en animales, particularmente al emplear roedores, debido a la complejidad de los efectos y, en algunos casos, a la sutileza de éstos. Lo anterior, dificulta la obtención de datos que permitan determinar la presencia, cuantificación de la severidad y descripción de la evolución de las alteraciones inducidas por la isquemia cerebral, así como los resultados de la intervención farmacológica a largo plazo. Experimentalmente se han probado moléculas capaces de reducir el daño estructural, es decir, el volumen del infarto, en animales de laboratorio, conocidas como neuroprotectoras; sin embargo, al emplearse en la clínica como parte del tratamiento en la fase aguda, se observan escasos efectos en la reducción del índice de mortalidad y poca efectividad en la limitación de la disfunción neurológica en los pacientes con infarto cerebral.

Existen ciertas restricciones en los modelos utilizados en el estudio de la isquemia cerebral que impiden la caracterización de lo sucedido a nivel clínico. A continuación, se enumeran las restricciones más importantes de estos modelos: 1) el empleo de animales jóvenes, aun cuando se tienen registros de casos en pacientes jóvenes la evidencia experimental señala que la población con mayor incidencia de EVC son los adultos mayores de 45 años, i. e., esta característica disminuye la sensibilidad de los modelos al trasladarlos a la clínica; 2) el uso de animales sanos, cabe señalar que la mayor parte de la población adulta se enfrenta a una serie de enfermedades propias de este grupo de edad, por lo que, las EVC no son las únicas enfermedades que deben tratar; 3) la evaluación de parámetros cuantitativos como el tamaño del infarto para determinar el efecto neuroprotector de los fármacos, lo cual difiere de los parámetros más importantes evaluados clínicamente, como son el índice de supervivencia, de discapacidad neurológica y de recuperación funcional de los pacientes que logran sobrevivir a un infarto cerebral y, 4) los modelos que focalizan el daño tisular causado por la isquemia cerebral. Las condiciones previamente descritas dieron como origen el modelo experimental de sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC) que se empleó en el presente proyecto. La identificación y evaluación de las alteraciones motoras y cognitivas hasta ahora se lleva a cabo con tareas que implican altos índices de exigencia motriz para los animales, como el laberinto acuático de Morris (1984) o

el laberinto radial (Olton & Samuelson, 1976) dificultando la discriminación del compromiso motor posterior a un evento isquémico de las alteraciones en aprendizaje y memoria. Otra característica restrictiva de algunos de los estudios es la exclusión de parámetros conductuales inherentes a los animales, es decir, en la literatura disponible no se reporta el despliegue conductual que los animales muestran dentro y fuera del ambiente experimental, ya que sin duda detectar cambios sutiles en los patrones de alimentación o sueño, por ejemplo, podrían indicarnos el impacto que la isquemia cerebral tiene en los sujetos sometidos al corte secuencial de las carótidas e identificar si la ejecución de las tareas se ve influenciada o no por estos cambios. Como se mencionó anteriormente, el laberinto elevado en cruz es una herramienta propuesta durante las últimas dos décadas como una tarea sencilla que permite evaluar aprendizaje y memoria; sin embargo, el paradigma empleado por Itoh et al. (1990; 1991) muestra una restricción importante que podría impedir la discriminación del compromiso motor del déficit cognitivo inducido por la isquemia cerebral, ya que se registra el tiempo que toma a los sujetos trasladarse de un brazo abierto a uno cerrado. Gracias a los estudios realizados por el grupo de Rodriguez, Santiago-Mejia, Fuentes, Gómez et al. (2003) y Rodriguez, Santiago-Mejia, Gómez et al. (2005) se determinó que el daño más importante es el compromiso motor; con base en estos hallazgos, se puede establecer que la principal desventaja al emplear este parámetro es la hipomotilidad exhibida por los animales isquémicos, por lo que se sugiere que el número de ensayos correctos podría ayudar en la detección del déficit cognitivo inducido por isquemia cerebral.

2.2 Preguntas de investigación

¿Es posible identificar mediante el modelo del laberinto elevado en cruz las alteraciones en la ejecución y el recuerdo inducidas por la isquemia cerebral aguda?

¿Es posible evaluar el efecto neuroprotector del dexrazoxano empleando el modelo de sección secuencial de las carótidas comunes?

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivos generales

1. Identificar la presencia de alteraciones inducidas en aprendizaje (ejecución) y memoria (recuerdo) inducidas por la isquemia cerebral aguda
2. Evaluar las alteraciones en aprendizaje y memoria inducidas por la isquemia cerebral aguda mediante una tarea en el laberinto elevado en cruz.
3. Describir el efecto neuroprotector del dexrazoxano como tratamiento de la isquemia cerebral aguda.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la administración de una dosis baja (32 mg/kg) y una dosis alta (128 mg/kg) de dexrazoxano en la modificación del déficit cognitivo del grupo SSACC.
2. Identificar el efecto del dexrazoxano en el porcentaje de sobrevida del grupo SSACC.
3. Describir si la modificación en el despliegue conductual de los animales tiene relación con la ejecución de la tarea en el EPM.
4. Postular el presente modelo como una estrategia útil para el estudio de las alteraciones cognitivas inducidas por la isquemia cerebral.

2.4 Hipótesis

2.4.1 Hipótesis de trabajo

1. La isquemia cerebral aguda inducida por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes produce alteraciones en la ejecución (aprendizaje) y recuerdo (memoria) de una tarea en los ratones sometidos al corte secuencial de las carótidas comunes.
2. La intervención farmacológica reduce el déficit cognitivo inducido por la isquemia cerebral aguda.
3. Las curvas de sobrevida de los grupos experimentales difieren en relación a la dosis empleada del fármaco.
4. Existen períodos críticos posteriores a la cirugía, en el desempeño de los sujetos isquémicos.

2.4.2 Hipótesis estadísticas

H₀: No existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ejecuciones correctas de los animales sujetos a isquemia cerebral respecto a los grupos control.

H₁: Existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ejecuciones correctas de los animales sujetos a isquemia cerebral respecto a los grupos control.

H₀: No existen diferencias estadísticamente significativas para establecer sobrevida de los animales.

H₁: Existen diferencias estadísticamente significativas para establecer sobrevida de los animales.

H₀: No existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ensayos correctos de los grupos tratados con fármaco.

H₁: Existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ensayos correctos de los grupos tratados con fármaco.

Se consideraron significativos todos los resultados con valor $p \leq 0.05$.

2.5 Variables bajo estudio

2.5.1 Determinación de variables

- a) Variable dependiente: número de ejecuciones correctas
- b) Variables independientes: sección de las arterias carótidas y dosis farmacológica (32 mg/kg y 128 mg/kg).

2.5.2 Definición conceptual y operacional de variables

Aprendizaje

Definición conceptual: cambio perdurable en las respuestas a una situación particular como resultado de la experiencia anterior con esa clase de situación (Domjan, 2003).

Definición operacional: igualación o superación de los criterios establecidos durante el entrenamiento y la fase de adquisición en relación al número de ensayos correctos.

Memoria de referencia

Definición conceptual: se refiere a todas las asociaciones que un organismo adquiere sobre su conducta, su entorno y las relaciones entre su conducta y su ambiente. Experimentalmente se refiere a las reglas de una tarea específica que se adquieren mediante ensayos repetidos (Honig, 1978; citado en Roberts, 1998; Domjan, 2003; Dudchenko, 2004).

Definición operacional: ingreso al brazo reforzado durante la fase de recuperación, lo cual implica el recuerdo de la regla general de la tarea, es decir, se observa un mayor número de ensayos correctos (ingreso al brazo reforzado) durante la fase de recuperación en relación a las 96h.

Neuroprotección

Definición conceptual: preservación de la integridad funcional y estructural del cerebro por cualquier tipo de intervención, a fin de detener los efectos perjudiciales de la isquemia, mediante el uso de fármacos que protejan al cerebro del daño neuronal, evitando la muerte celular (Hossmann, 2006; Green et al., 2003; Wahlgren & Ahmed, 2004).

Definición operacional: reducción del volumen tisular de infarto en los sujetos SSACC como consecuencia de la intervención, así como un incremento en el número de ensayos correctos.

Despliegue conductual

Definición conceptual: conjunto de comportamientos característicos observables y registrables de una especie o de un solo miembro de la misma en su ambiente.

Definición operacional: conjunto de patrones conductuales exhibidos por los sujetos: sueño, ingesta de alimento y agua, interacción social, autocuidado y otras conductas.

2.6 Unidad experimental

- a) Cada grupo bajo estudio fue considerado una unidad experimental.

2.7 Diseño experimental

De acuerdo con Campbell & Stanley (1973), la presente investigación es un diseño *cuasiexperimental* de bloques incompletos (Anderson & McLean, 1974; Méndez, 1977; Méndez, Namihira y Fortul, 1984) ya que la asignación de unidades experimentales a los grupos no fue aleatoria, pues para facilitar el manejo de los animales éstos se alojaron de 3 a 4 sujetos por caja habitación, por lo que sólo la asignación de las cajas a los bloques se realizó aleatoriamente. Es decir, cada unidad experimental no contuvo más que una parte de los tratamientos establecidos. Para este diseño se emplearon 226 animales divididos en tres grupos: SSACC, sham y control. El grupo SSACC lo integraron 123 animales asignados aleatoriamente a tres subgrupos: a) vehículo (solución salina; n=34), b) dosis baja (32 mg/kg; n=45) y, c) dosis alta (128 mg/kg; n=44) de dexrazoxano i. p. Cada uno de estos grupos se evaluó a la par del grupo sham (N=54, asignados a tres muestras) y el grupo control (N=49, divididos en 3 grupos). Cabe mencionar que las muestras finales de sujetos que participaron en la evaluación conductual se modificó debido al procedimiento quirúrgico, pues los porcentajes de sobrevivencia son variables para cada uno de los grupos experimentales, así como por los criterios mencionados anteriormente. Por ejemplo, para la primera cirugía se tuvo una n=41 y para la segunda cirugía fue una n=24.

2.7.1 Criterios de inclusión

A lo largo del experimento se establecieron diferentes criterios de inclusión dependientes de la fase, es decir, para la conformación de la muestra inicial se trabajó con ratones macho envejecidos (40-60 semanas de edad) de la cepa CFW Taconic; sin embargo, durante el entrenamiento se estableció que aquellos sujetos que lograran el 50% de ensayos correctos las últimas dos sesiones de la fase continuarían con la evaluación de la línea base y, posteriormente, con la fase de adquisición (evaluación postcirugía); esta fase se conformó por cuatro sesiones de tres ensayos cada una, es decir, 12 ensayos. Para formar parte de la muestra a evaluar en la fase de recuperación, los sujetos tuvieron que lograr el 85% de ensayos correctos durante la fase previa (adquisición), esto es, 10 ensayos.

2.8 Animales

En todos los bloques experimentales se emplearon ratones macho envejecidos (40 a 60 semanas de edad), de la cepa CFW (obtenidos inicialmente de la casa Taconic Farma, Germantown, NY) de 35 a 55 g de peso corporal, adquiridos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. En cada caja habitación se colocaron de 3 a 4 animales de la misma camada en una sala de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($55 \pm 3\%$), con un ciclo de luz-oscuridad normal (luz de 7 a. m. a 7 p. m.); se permitió a los animales aclimatarse a las condiciones ambientales de la sala por al menos una semana previa a los experimentos, durante esta semana los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua y alimento (Purina Chow, St. Louis, MO, USA). Dieciocho a veinticuatro horas previas a los experimentos el alimento fue retirado, manteniendo libre únicamente el acceso al agua. La cirugía y las observaciones neuroconductuales se realizaron durante el ciclo de luz, es decir entre las 09:00-18:00 h. Todos los protocolos experimentales se efectuaron conforme a la ética experimental establecida en el Reglamento de la Ley General en Materia de Investigación para la Salud de México (NOM 062-ZOO-1999: Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de Animales de Laboratorio; Secretaría de Salud, 1999). La muestra inicial de cada grupo en cada bloque se eligió aleatoriamente; sin embargo, a partir de la línea base y hasta la fase de recuperación, la muestra fue no probabilística, intencional, debido a que los sujetos tuvieron que lograr los criterios de inclusión previamente mencionados (apartado 2.6.1).

2.9 Procedimiento

El experimento se estructuró en cuatro fases: a) entrenamiento; b) línea base; c) adquisición y d) recuperación. Durante las fases b, c y d, el reforzador se encontró disponible al final del brazo meta (BR^+). Como brazo de salida (BS) se empleó el brazo abierto distal a la lámpara (Fig. 5). Cada sesión en la línea base, adquisición y recuperación tuvo un total de tres ensayos, con 1 min como tiempo límite para su ejecución. El reforzador utilizado fue una gota de leche entera azucarada; para endulzar la leche se empleó leche condensada. Al finalizar cada ensayo se trasladó a los sujetos a sus cajas habitación.

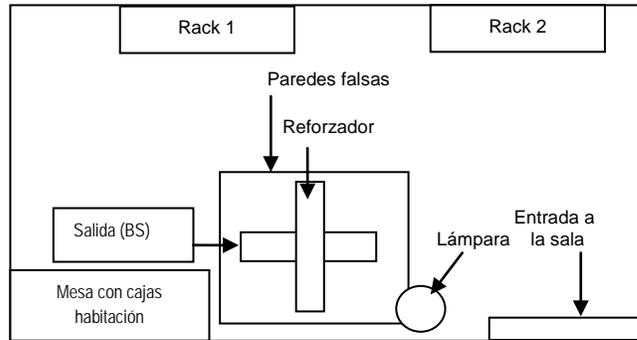


Fig. 5. Esquema de ubicación del laberinto dentro del cuarto de exploración. BS= brazo de salida.

Entrenamiento

Esta fase se llevó a cabo en cuatro sesiones continuas, las primeras dos sesiones tuvieron una duración de 3 min cada una; la duración de las últimas dos sesiones dependió del ingreso de los animales al brazo reforzado. Al concluir los ensayos se retiró a cada sujeto del laberinto para limpiarlo con alcohol al 10% para dar paso a una nueva sesión. El ingreso a los brazos cerrados se reforzó con una gota de leche entera azucarada. La primera y segunda sesiones, cada vez que el sujeto se encontró cerca de la entrada del brazo reforzado (BR^+) se depositó cerca de éste una unidad del reforzador (R^+). La tercera sesión el R^+ se colocó en el brazo de salida (BS), el centro del laberinto y el BR^+ . Finalmente, en la cuarta sesión, el reforzador se mantuvo disponible al final del BR^+ . Durante la tercera y cuarta sesiones, cada vez que el sujeto ingresó al brazo no reforzado, éste se colocó de inmediato en el brazo de salida; si el ingreso fue en el BR^+ , se permitió al sujeto permanecer por 10 seg en el brazo. Este procedimiento se llevó a cabo en 3 ensayos con 1 min como tiempo límite para ejecutar la tarea. Al concluir el entrenamiento y, para continuar con la siguiente fase, los sujetos que durante la tercera y cuarta sesiones no cumplieron con el 50% de ensayos correctos, fueron excluidos. La distribución de los animales a los grupos se realizó antes de comenzar el entrenamiento.

Línea base

Al finalizar el entrenamiento se realizó el registro basal en una sesión. Los ensayos concluyeron cada vez que los animales ingresaron al brazo meta o el tiempo límite se consumió. Al concluir esta fase y tras un período de 2 días se seccionó la arteria carótida izquierda (primera cirugía).

Fase de adquisición

Después de la primera y segunda cirugías, se evaluó a los animales a las 24, 48, 72 y 96h posteriores al procedimiento quirúrgico bajo el protocolo descrito en la línea base. El objetivo de esta fase fue evaluar la ejecución de los animales isquémicos comparados con los grupos sham y control. Al término de esta etapa se excluyó para la siguiente fase a los sujetos que no lograron el 85% de ejecuciones correctas para evaluar la fase de recuperación.

Fase de recuperación

Esta fase se evaluó 7 días después de concluir la fase de adquisición tras la primera y segunda cirugías. El objetivo fue evaluar memoria de referencia en los animales que sobrevivieron a la sección de las arterias carótidas comunes y sus homólogos. El procedimiento fue tal como se describió a partir de la línea base. Cabe mencionar que, previo a la segunda cirugía se evaluó a los sujetos en las condiciones de la tercera y cuarta sesiones de entrenamiento y hasta concluir con la fase de recuperación. La secuencia temporal del experimento se muestra en la Fig. 6.

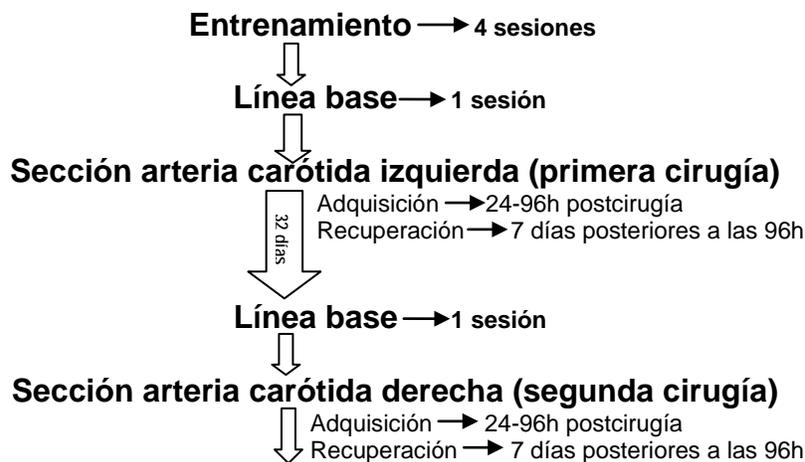


Fig. 6. Distribución temporal de las fases experimentales.

2.9.1 Aparatos

Se utilizó un laberinto elevado en cruz de acrílico (Fabricante independiente) que consta de dos brazos abiertos de color blanco de 48.65 cm de largo con una separación de 7.25 cm y dos brazos cerrados de color negro de 49.15 cm de largo separados por una distancia de 7.25 cm correspondientes al ancho de los brazos abiertos, la altura de las

paredes es de 17.05 cm, la altura total de 47.75 cm. El laberinto se colocó sobre un cajón de madera a 27 cm del piso, alrededor se colocaron paredes falsas de vinil color negro con una altura de 1 m y 60 cm de ancho para simular un espacio cerrado (Fig. 5) y controlar la cantidad de información disponible en el ambiente. La luz general se apagó para dejar únicamente encendida una lámpara de luz blanca de 15 watts ubicada a 119 cm del piso.

2.9.2 Procedimiento quirúrgico

La isquemia cerebral se indujo mediante el procedimiento de sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC; Rodriguez, Rodriguez-Boscan et al., 2000). Bajo anestesia leve con éter, se realizó una incisión en la cara anterior del cuello, separando cuidadosamente la arteria carótida común izquierda del nervio vago (Fig. 7) y, excepto en el grupo sham, se seccionó entre dos ligaduras; 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. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia fueron colocados nuevamente en sus cajas habitación. Treinta y dos días después de la sección de la arteria carótida izquierda se realizó el mismo procedimiento para la arteria contralateral. Como grupos control se utilizaron ratones sin anestesia ni cirugía (control) y ratones con anestesia y procedimiento quirúrgico, excepto ligaduras y sección de las arterias carótidas (sham).

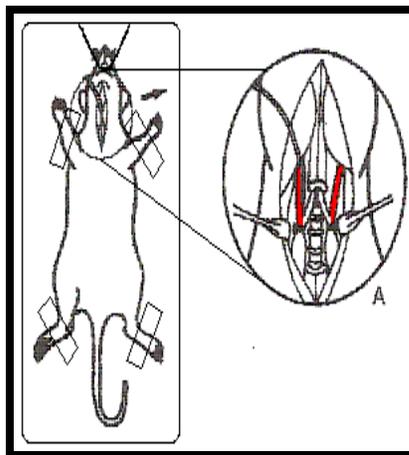


Fig. 7. Procedimiento quirúrgico realizado a los sujetos SSACC y sham. El sujeto es fijado de su tren anterior y superior, así como de sus dientes para restringir sus movimientos durante la cirugía. **A:** ilustra las arterias carótidas comunes que se ligaron y seccionaron (tomado de Roda, Carceller, Pascual, Herguido, González-Llanos, Alonso de Leciana...Díez-Tejedor, 1998).

2.9.3 Prueba farmacológica

Los resultados obtenidos en 2003 por Rodríguez, Santiago-Mejía et al. indican que las dosis 32 mg/kg (dosis baja) y 128 mg/kg (dosis alta) tienen un efecto neuroprotector, es decir, se observó una reducción en el índice mortalidad y las alteraciones neuroconductuales inducidas por la SSACC. Las dosis mencionadas permitieron evaluar el efecto del fármaco en las alteraciones observadas en los animales tanto conductuales como cognitivas. La administración se realizó 15 minutos después de la segunda cirugía (Jordan, Behlendorf, Mueller, & Schmoll, 2009). Como ya se mencionó, los animales del grupo SSACC se dividieron en tres grupos para recibir dosis diferenciales i. p. del fármaco o solución salina.

2.9.4 Mortalidad

Después de la primera y segunda cirugías, se registró consecutivamente cada 24h y hasta el final de la fase de adquisición (96h) el número de muertes para calcular las curvas de sobrevivencia, así como el efecto de la administración de dexrazoxano sobre éstas.

2.9.5 Evaluación de la lesión isquémica

La evaluación de la lesión isquémica inducida en los modelos experimentales es importante para determinar la eficacia que los tratamientos farmacológicos ejercen en la reducción de la lesión. Dentro de los métodos histopatológicos empleados para la evaluación del daño isquémico cerebral se encuentra el uso del Clorhidrato de Trifeniltetrazodion (TTC), un colorante que tiñe de rojo el tejido sano al reaccionar con las mitocondrias activas (Prieto-Arribas et al., 2008). El estudio histopatológico con TTC de los animales sometidos al corte secuencial de las carótidas comunes, señala que el daño cerebral se presenta en ambos hemisferios; no obstante, es en el hemisferio 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 (Auer et al., 1986; Rodríguez, Gerson et al., 2000; Rodríguez, Rodríguez-Boscan et al., 2000). Para evaluar el efecto neuroprotector del tratamiento farmacológico, previo a la segunda cirugía y a las 24 y hasta las 96h se sacrificó un animal de cada grupo con una sobredosis i. p. de pentobarbital (47 mg/kg). Cada uno de los animales se decapitó para extraer cuidadosamente los cerebros y colocarlos en refrigeración por 10 min para facilitar su manipulación. Posteriormente, los

cerebros se situaron en una matriz de cortes coronales con 1 mm de grosor para realizar los cortes a la altura del bulbo olfatorio y hasta el cerebelo. Los cortes obtenidos se colocaron en solución al 2% de TTC por 30 min (Khan, 2000). Transcurrido este tiempo, los cortes se situaron en una caja de Petri con solución salina para su acomodo antero-posterior. Bajo un microscopio estereoscópico se acomodaron uno por uno los cortes para fotografiarlos con una cámara digital Olympus SZ61, facilitando así, la delimitación y cuantificación de la región isquémica o de infarto cerebral. Se consideró como tejido dañado aquel tejido que durante la tinción no adquirió coloración alguna.

2.10 Análisis estadístico

Las curvas de supervivencia se calcularon con el método Kaplan-Meier y se contrastaron con la prueba de rangos logarítmicos. El promedio de ensayos correctos se comparó con el análisis de varianza de una clasificación (One-way ANOVA); para determinar si existía algún período crítico dentro de la fase de evaluación se empleó el ANOVA de medidas repetidas de un factor. La evaluación del efecto farmacológico sobre la ejecución de la tarea se realizó mediante la prueba *t* de Student para muestras independientes, la comparación realizada fue entre los grupos SSACC. En el caso de la evaluación de la lesión isquémica, se reportan únicamente los volúmenes totales y el porcentaje de la zona de infarto.

III. RESULTADOS

3.1 Experimento preliminar. Ejecución de la tarea en el EPM y detección de patrones conductuales

3.1.1 Condiciones experimentales

El entrenamiento se realizó durante 8 sesiones continuas, distribuidas de la siguiente forma (Tabla 1):

Tabla 1.

Distribución temporal de la fase de entrenamiento del experimento preliminar.

| Sesión | Condición |
|--------|---|
| 1 | Liberación del R ⁺ en intervalos de 15 seg |
| 2 | |
| 3 | R ⁺ en BS y BD |
| 4 | |
| 5 | R ⁺ en BS y BI |
| 6 | |
| 7 | R ⁺ en BS y BI |
| 8 | R ⁺ en BS y BD |

Nota: R⁺= Reforzador, BS= brazo de salida, BD= brazo derecho, BI= brazo izquierdo.

Cada una de las sesiones de entrenamiento tuvo una duración de 4 min; a partir de la quinta sesión, cada vez que el sujeto ingresó a cualquiera de los brazos cerrados éste se devolvió al BS para continuar con la sesión. Al término de esta fase se registró la línea base, después de la cirugía, a las 24, 48 y 72h también se realizó la evaluación de la ejecución de la tarea. Como tiempo límite se determinó un intervalo de 60 seg por ensayo, es decir, se cronometró manualmente el tiempo desde que se colocó al sujeto en el BS y hasta que éste ingresó y probó el R⁺ en el brazo correspondiente; si al finalizar este tiempo el sujeto no había ingresado al BR⁺ se retiraba del laberinto para dar paso a otro ensayo o sujeto. Cada sesión experimental se conformó por un total de 6 ensayos.

3.1.2 Resultados de la ejecución

a) Primera cirugía

En la Fig. 8 se representan las medias y desviaciones estándar obtenidas en cada fase de registro de cada grupo experimental. Durante la línea base el grupo control (n=7) ejecutó en promedio 1.29 ensayos correctos, a las 24h este promedio incrementó a 2.57 que fue su promedio más alto, ya que durante los siguientes períodos de evaluación su rendimiento disminuyó, finalizando el experimento con 1.14 ejecuciones correctas promedio.

En el caso del grupo sham (n=9), el promedio basal fue de 2 ensayos; a las 24h se registró un incremento hasta alcanzar 2.67 ensayos correctos; sin embargo, las siguientes fases este promedio no se mantuvo hasta el final de la evaluación, pues a las 48h ejecutó 2 ensayos correctos, mientras que a las 72h registraron su ejecución más baja, esto es, 1.44 ensayos correctos promedio. Finalmente, en el caso del grupo SSACC (n=26) la basal fue de 1.65 ensayos correctos; a las 24 y 48h este promedio incrementó a 1.85 y 2.42, respectivamente, que a las 72h disminuyó a 2.19 ejecuciones correctas. Cabe mencionar que a las 48 y 72h la ejecución de la tarea del grupo SSACC fue mejor que la observada en los grupos sham y control.

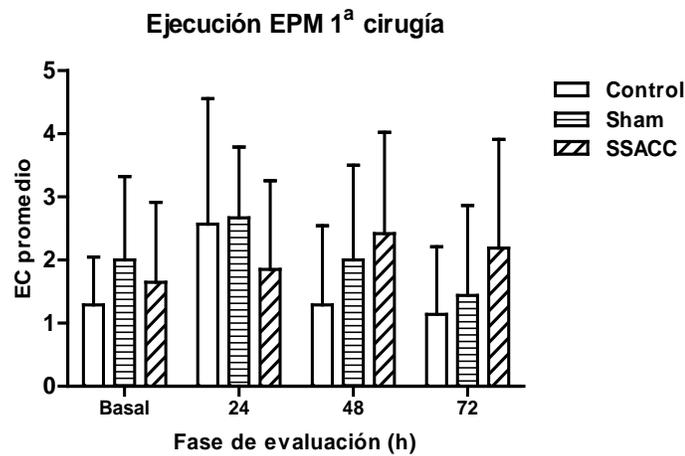


Fig. 8. Promedio de ensayos correctos y desviación estándar de la primera cirugía. EC=ensayos correctos.

Los resultados obtenidos al aplicar el análisis de varianza de una clasificación se muestran en la tabla 2; aunque el grupo control obtuvo una puntuación por debajo de los grupos sham e isquémico, el análisis aplicado no reveló diferencias estadísticamente significativas, es decir, la ejecución de los grupos fue similar.

Tabla 2.

Resultados del análisis de varianza aplicado a los datos de la primera cirugía.

| Fase | <i>F</i> | <i>p</i> |
|-------|----------|----------|
| Basal | .687 | .509 |
| 24h | 1.418 | .254 |
| 48h | 1.566 | .222 |
| 72h | 1.611 | .213 |

Nota: 24-96h= períodos de evaluación posteriores a la sección de la carótida izquierda.

En relación al ANOVA de medidas repetidas, en el gráfico de perfil (Fig. 9) es posible observar que la ejecución de los animales isquémicos mejoró después de la primera cirugía (sección de la carótida izquierda), esto es, a las 24 y 48h, a pesar de la reducción registrada al final del experimento (72h). Al estudiar el efecto del factor *faseval* o intra-sujetos mediante los estadísticos univariados, los resultados indican que el efecto de este factor no fue estadísticamente significativo $F(3)=2.503$, $p=.066$, es decir, el promedio de ejecuciones correctas fue la misma a través del tiempo.

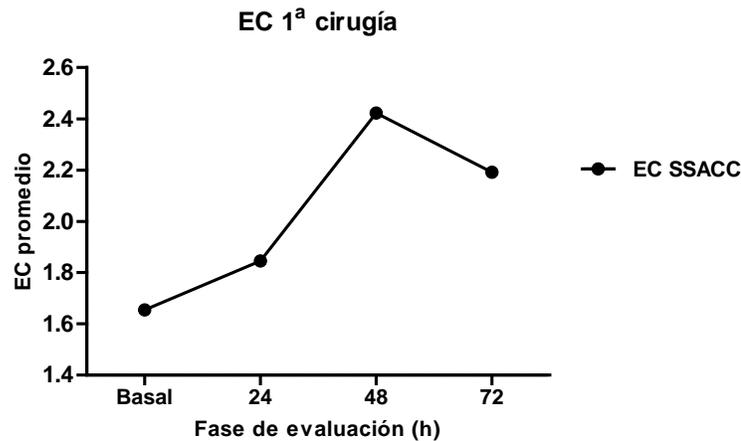


Fig. 9. Gráfico de perfil correspondiente a la primera cirugía. EC= ensayos correctos.

b) Período inter-cirugías

En la Fig. 10 se representan las medias y desviaciones estándar de los ensayos correctos de cada grupo durante la primera, segunda y tercera semanas posteriores a la sección de la carótida izquierda. El único grupo en el que se observó un incremento gradual en su media de ejecuciones fue el grupo control, pues durante la primera semana de evaluación posterior a la primera cirugía registró 0.60 ensayos correctos, la segunda semana 0.80 y la tercera semana 1.20. En cambio, en los grupos sham y SSACC las ejecuciones no fueron constantes; por un lado, el grupo sham registró una media de 1.29, que incrementó a 1.86 ensayos correctos, que no logró mantener hasta el final de la evaluación, al disminuir a 1 ensayo correcto. Por otra parte, en el caso del grupo SSACC la primera semana de evaluación ejecutó en promedio 1.57 ensayos correctos que incrementaron a 1.83 la segunda semana; sin embargo, al finalizar el período de evaluación, al igual que el grupo sham, registró una disminución, ejecutando sólo 1.61 ensayos correctos. Es decir, la

ejecución del grupo SSACC durante la primera y tercera semanas fue mejor que la de los grupos control; la segunda semana la ejecución de los grupos sham e isquémico fue similar.

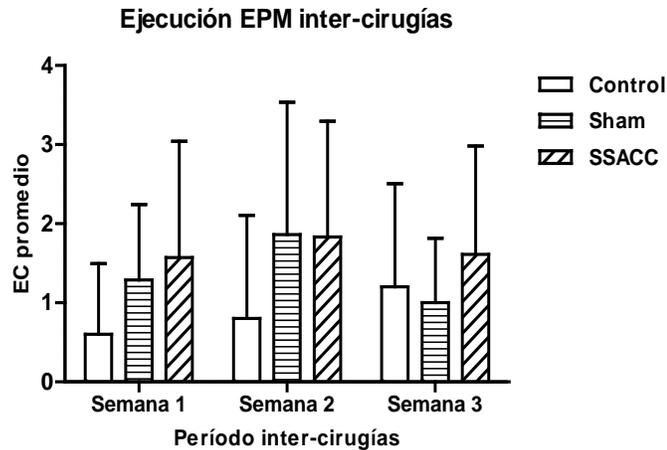


Fig. 10. Medias y desviaciones estándar registradas durante el período de recuperación posterior a la primera cirugía. EC= ensayos correctos.

Los resultados del análisis de varianza de una clasificación se presentan en la Tabla 3, los cuales señalan que no existen diferencias estadísticamente significativas en la ejecución de la tarea de los grupos experimentales en ninguna de las fases evaluadas.

Tabla 3.

Análisis de varianza de una clasificación aplicado a la fase inter-cirugías.

| Fase | <i>F</i> | <i>p</i> |
|----------|----------|----------|
| Semana 1 | 1.106 | .343 |
| Semana 2 | 1.103 | .368 |
| Semana 3 | .702 | .503 |

Nota: semana 1-3= período inter-cirugías.

Aunque descriptivamente el gráfico de perfil (Fig. 11) sugiere que durante la segunda semana post-cirugía el promedio de ensayos correctos de los grupos sham y SSACC mejoró, el análisis de varianza de medidas repetidas indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ensayos correctos, $F(2)=.392$, $p=.678$, esto es, la ejecución de los sujetos fue la misma a través del tiempo.

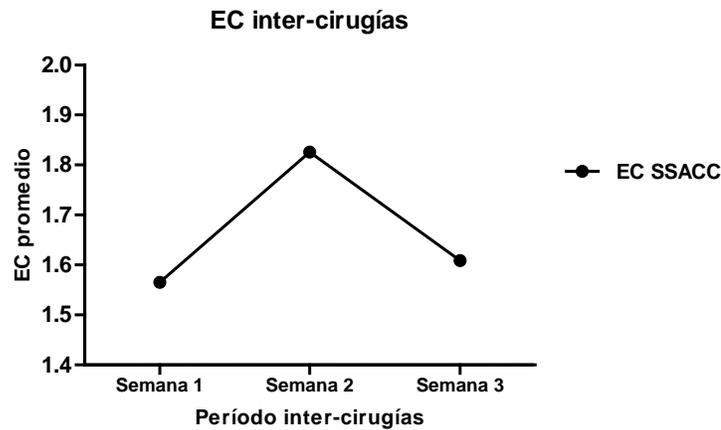


Fig. 11. Gráfico de perfil del factor *faseval*. EC= ensayos correctos.

c) Segunda cirugía

En la Fig. 12 se puede observar que durante la línea base el grupo control ejecutó en promedio 1 ensayo correcto; 0.67 ensayos correctos a las 24h; a las 48h registró un incremento de una unidad, al realizar 1.67 ensayos correctos pero, a las 72h este promedio descendió nuevamente, ejecutando únicamente 1 ensayo. En el caso del grupo sham, la basal registrada fue el promedio más bajo de todo el experimento, es decir, 1.25 ensayos correctos; a partir de las 24h y hasta la conclusión del experimento, el promedio de ensayos correctos fue de 2. El grupo isquémico registró una basal de 1.50 ejecuciones correctas que, tras la sección de la carótida derecha disminuyó a 0 durante las 24 y 48h; sin embargo, a las 72h ejecutó un promedio de 2 ensayos correctos, sugiriendo recuperación en los animales isquémicos.

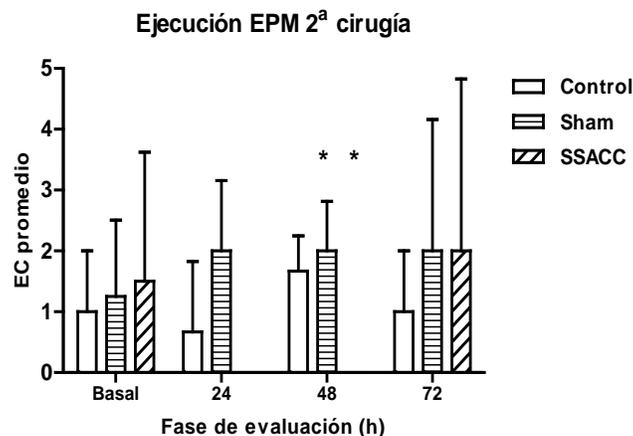


Fig. 12. Medias y desviación estándar de *ensayos correctos*, de cada grupo experimental. EC= ensayos correctos. * $p \leq 0.05$.

El análisis de varianza de una clasificación aplicado a los datos obtenidos durante la segunda cirugía (Tabla 4), indicó diferencias estadísticamente significativas a las 48h posteriores a la segunda cirugía; sin embargo, en la fase basal (previa a la cirugía) y a las 24 y 72h después de la segunda cirugía, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Mediante la prueba *post hoc* de Scheffé (Tabla 5) fue posible corroborar que las diferencias estadísticamente significativas fueron entre los grupos SSACC y sham ($p=.037$).

Tabla 4.

Análisis de varianza de una clasificación, segunda cirugía.

| Fase | F | p |
|-------|-------|-------|
| Basal | .081 | .923 |
| 24h | .138 | .138 |
| 48h | 6.250 | .034* |
| 72h | .250 | .787 |

Nota: 24-96h= periodos de evaluación posteriores a la sección de la carótida derecha. * $p\leq 0.05$

Tabla 5.

Comparaciones *post hoc* de Scheffé, segunda cirugía (sección de la carótida derecha).

| Fase | Grupo asignado (I) | Grupo asignado (J) | M | P |
|------|--------------------|--------------------|--------|-------|
| 48h | Sham | SSAAC | 2.000 | .037* |
| | SSACC | Sham | -2.000 | .037* |

Nota: M= media. * $p\leq 0.05$

Es importante señalar que para esta fase experimental se aplicó el análisis de varianza de medidas repetidas; sin embargo, los resultados fueron inconsistentes, por lo que no fue posible identificar la existencia de períodos críticos de recuperación.

3.1.3 Detección de patrones conductuales

Se registró aleatoriamente una muestra de animales ($n=9$) dentro de sus cajas habitación para determinar cuáles eran los patrones conductuales exhibidos con mayor frecuencia por los animales dentro de sus cajas para así describir si tenían alguna relación con el desempeño de los animales en la ejecución de la tarea. Los patrones conductuales identificados fueron: sueño, se consideró que los animales dormían si permanecían inmóviles en un área específica y su desplazamiento y actividad disminuían; autocuidado, que incorporó conductas como acicalar o lamer su cuerpo; ingesta de agua y alimento,

interacción social, se registró como interacción el contacto por varios segundos del objetivo con alguno de sus compañeros. Finalmente, en la categoría otras conductas, se incluyeron las conductas menos frecuentes como agresividad, que se identificó cada vez que el objetivo iniciaba una pelea con cualquier miembro de la caja habitación, desplazamiento de la astilla (enterramiento) y exploración de la caja. Los registros observacionales se realizaron manualmente por un período de 20 min, para lo cual se cronometró cuánto tiempo invertían los animales en una u otra conducta. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 13.

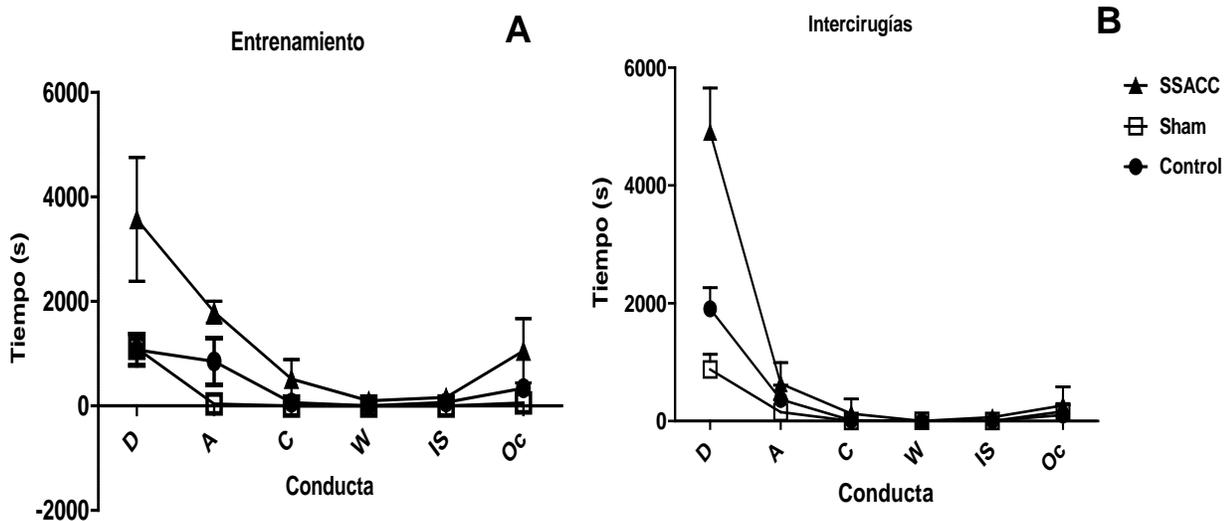


Tabla 6.

Tiempo promedio y desviación estándar de los patrones conductuales registrados durante el entrenamiento.

| Patrón conductual | Grupo | | | | | |
|-------------------|---------|---------|---------|-------|---------|--------|
| | SSACC | | Sham | | Control | |
| | M | s | M | s | M | s |
| D | 3569.25 | 1186.53 | 1103.50 | 68.91 | 1074.00 | 298.32 |
| A | 1795.50 | 208.35 | 37.25 | 29.74 | 853.50 | 447.48 |
| C | 517.00 | 369.62 | 0.00 | 0.00 | 65.00 | 130.00 |
| W | 99.00 | 30.65 | 0.00 | 0.00 | 2.25 | 2.63 |
| Is | 161.75 | 130.62 | 0.00 | 0.00 | 66.25 | 100.10 |
| Oc | 1054.25 | 614.50 | 57.75 | 77.57 | 339.00 | 60.25 |

Nota: M= media, s= desviación estándar, D= sueño, A= autocuidado, C= ingesta de alimento, W= ingesta de agua, Is=interacción social, Oc= otras conductas.

Tabla 7.

Tiempo promedio y desviación estándar de los patrones conductuales registrados durante la fase inter-cirugías.

| Patrón conductual | SSACC | | Grupo Sham | | Control | |
|-------------------|---------|--------|------------|--------|---------|--------|
| | M | s | M | s | M | s |
| D | 4903.00 | 748.20 | 877.50 | 255.27 | 1906.50 | 356.95 |
| A | 636.50 | 356.07 | 151.00 | 210.72 | 365.75 | 241.18 |
| C | 124.75 | 249.50 | 0.0 | 0.0 | 15.00 | 30.00 |
| W | 2.00 | 4.00 | 6.00 | 8.49 | 1.25 | 2.50 |
| Is | 67.25 | 109.37 | 0.0 | 0.0 | 7.25 | 14.50 |
| Oc | 266.50 | 316.00 | 165.50 | 36.06 | 104.25 | 168.55 |

Nota: M= media, s= desviación estándar, D= sueño, A= autocuidado, C= ingesta de alimento, W= ingesta de agua, Is=interacción social, Oc= otras conductas.

Los resultados de los registros observacionales indicaron que durante las sesiones de entrenamiento (**A**) los patrones conductuales exhibidos por el grupo isquémico (n=5) con mayor frecuencia fueron sueño (D), autocuidado (A), otras conductas (Oc) e ingesta de alimento (C). Respecto al grupo sham (n=1), el despliegue conductual registrado fue diferente y poco, ya que la mayor parte del tiempo el sujeto durmió. Finalmente, el grupo control (n=2) exhibió un mayor despliegue conductual comparado con los grupos SSACC y sham, pues las principales conductas registradas fueron sueño y autocuidado, así como otras conductas registrando tiempos muy parecidos. Durante la fase *inter-cirugías* (**B**) no se observaron cambios en relación al despliegue conductual exhibido por los sujetos; por ejemplo, en el caso del grupo control (n=2), se observó un incremento en el tiempo que durmieron y una disminución en autocuidado respecto a la fase de entrenamiento. Por otra parte, los patrones conductuales del sujeto del grupo sham no mostraron cambios aparentes durante los registros, manteniéndose sueño como el patrón conductual más frecuente durante las sesiones. El grupo SSACC también incrementó el tiempo invertido en dormir, por lo que disminuyó el tiempo empleado en autocuidado; reduciéndose entonces, su despliegue conductual posterior a la primera cirugía y durante el período de recuperación.

3.1.4 Mortalidad

a) Primera cirugía.

Durante la primera cirugía no se registraron muertes en los sujetos del grupo control (n=7), por lo que se consideró como el 100% del índice de sobrevivencia. En el grupo sham (n=12), al que sólo se manipuló la carótida, se observó una muerte posterior a las 48h, alcanzando un porcentaje de sobrevivencia de 91.67%, que se mantuvo hasta las 96h. En el

grupo SSACC (n=44), los porcentajes de supervivencia registrados fueron 95.45%, 86.36% y 81.82% a las 24, 48 y 72h, respectivamente; cabe mencionar que este porcentaje se mantuvo hasta el final del registro, es decir, a las 96h (Fig. 14). Al comparar las curvas de supervivencia posteriores a la primera cirugía, el análisis estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas.

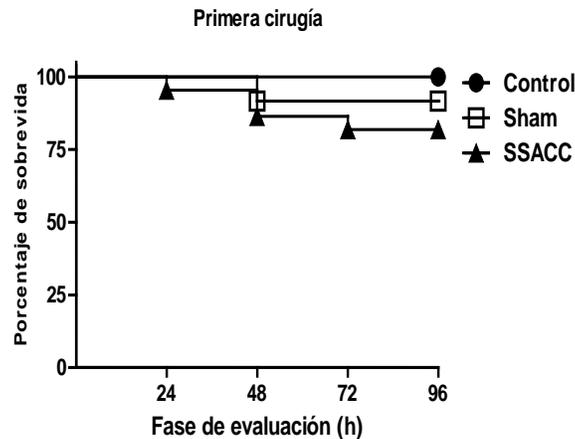


Fig. 14. Curvas de supervivencia de la primera cirugía, la comparación no resultó significativa.

b) Segunda cirugía

Tras la sección de la carótida derecha, 32 días después de la primera cirugía, el número de animales se mantuvo únicamente para el grupo control (n=7), lo que permitió considerar este como 100% en el porcentaje de supervivencia. En el caso del grupo sham, la manipulación de la carótida izquierda modificó la muestra para la segunda cirugía (n=9); no obstante, la manipulación de la carótida derecha, no se produjeron muertes en este grupo, es decir, el porcentaje de supervivencia fue del 100%. Por otra parte, la sección de la carótida derecha produjo un alto índice de mortalidad en el grupo SSACC, lo que redujo su porcentaje de supervivencia a 15.62% a las 24h; 6.25% a las 48h y 3.12% a las 72h; cabe mencionar que este fue el último período de registro para este grupo ya que en esta fase de registro, sólo sobrevivió un sujeto hasta las 72h (Fig. 15). La comparación mediante la prueba de rangos logarítmicos reveló diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en las curvas de supervivencia de los grupos.

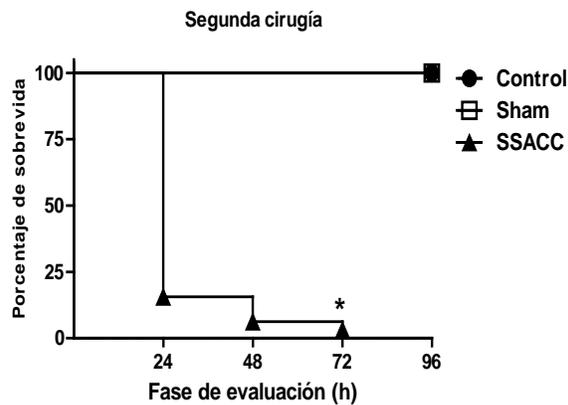


Fig. 15. Curvas de supervivencia de los grupos experimentales correspondientes a la segunda cirugía. * $p \leq 0.05$.

3.2 Experimento final

3.2.1 Condiciones experimentales

Las condiciones experimentales previamente descritas, permitieron establecer los criterios bajo los cuales se evaluó la tarea en el experimento final. Cabe mencionar que, además de contabilizar el número de ejecuciones correctas realizadas por cada sujeto, también se registró la latencia de transferencia correspondiente a cada ensayo, es decir, el tiempo que tardó el sujeto en cruzar del brazo de salida al brazo reforzado y consumir el reforzador. Para este experimento, el período de evaluación se extendió hasta las 96h post-cirugía además de la implementación de la fase de recuperación, evaluada una semana después de las 96h.

3.2.2 Resultados de la ejecución

a) Primera cirugía

Los datos obtenidos indican que, tras la implementación de los nuevos criterios de evaluación (con un nuevo lote de animales), la ejecución del grupo control ($n=11$) mejoró después del registro basal, donde obtuvo un promedio de 1.27 ensayos correctos; a las 24 y 48h el promedio registrado fue 1.73 y 2.27 ensayos correctos, respectivamente. Sin embargo, a las 72h el promedio observado disminuyó a 1.73 ensayos correctos, mientras que a las 96h incrementó, alcanzando un promedio de 2 ejecuciones correctas (Fig. 16). Durante la basal, el grupo sham ($n=15$) obtuvo su promedio más alto de toda la evaluación, es decir, 1.60 ejecuciones correctas; a las 24h su promedio se redujo a 1.07 ensayos; sin embargo, a partir de las 48 y hasta las 96h su desempeño mejoró al registrar 1.33, 1.33 y

1.53 ensayos correctos, respectivamente. En el caso del grupo isquémico (n=15), el promedio registrado para la basal fue de 1.60 ensayos correctos que disminuyó a 1.07 a las 24h. Cabe mencionar que al igual que el grupo sham, a partir de las 48h la ejecución de los animales mejoró, obteniendo un promedio de 1.27 ensayos a las 48h y 1.53 a las 72 y 96h. Es importante señalar que durante la fase de recuperación, los promedios se modificaron para cada uno de los grupos, así como también el número de sujetos evaluados. El promedio registrado para el grupo control (n=4) fue 1 ensayo correcto; mientras que para el grupo sham (n=3) el promedio de ejecuciones correctas fue 2.66. Finalmente, el grupo isquémico (n=2) registró el promedio más alto de los tres grupos, es decir, 3 ensayos correctos, es posible identificar en la gráfica que el grupo isquémico y el grupo sham tuvieron un desempeño muy similar a pesar del procedimiento quirúrgico correspondiente, aun cuando éste es menor al desempeño del grupo control a partir de las 24 y hasta las 96h. Sin embargo, en la fase de recuperación los resultados se muestran diferentes, ya que el promedio de ensayos correctos de los grupos sham e isquémico se encuentra por encima de los registrados por los animales control, de hecho, de los tres grupos el SSACC fue el que obtuvo los mejores resultados de toda la evaluación.

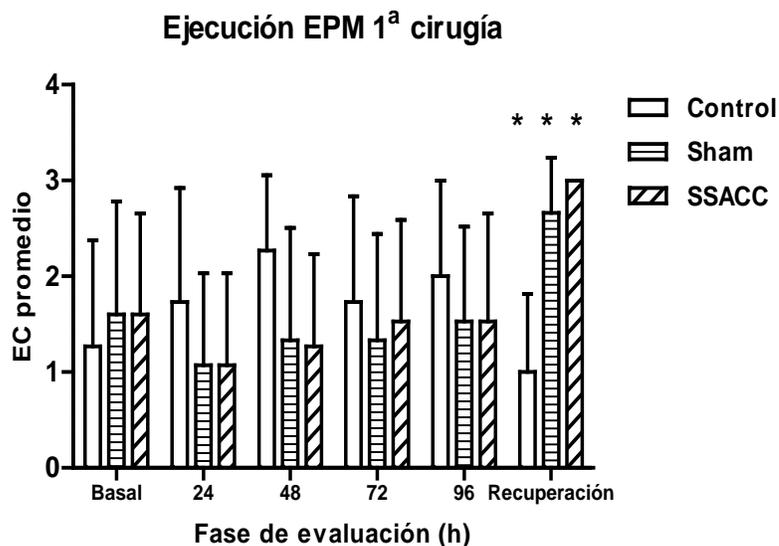


Fig. 16. Ensayos correctos promedio y desviación estándar de cada grupo. EC= ensayos correctos. * $p \leq 0.05$.

El análisis de varianza de una clasificación (Tabla 8) aplicado al número de ensayos correctos tras la primera cirugía, indicó que las únicas fases de evaluación donde se presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron a las 48h post-cirugía y la fase de recuperación. Gracias a la prueba *post hoc* de Scheffé fue posible determinar que durante la fase de recuperación las principales diferencias se observaron entre el grupo control y los grupos sham e isquémico (Tabla 9).

Tabla 8.

Análisis de varianza de una clasificación aplicado al promedio de EC (primera cirugía, experimento final).

| Fase | F | p |
|--------------|-------|-------|
| Basal | .346 | .710 |
| 24h | 1.666 | .202 |
| 48h | 3.780 | .032* |
| 72h | .418 | .661 |
| 96h | .803 | .455 |
| Recuperación | 8.250 | .019* |

Nota: EC= ensayos correctos; 24-96h= períodos de registro posteriores a la primera cirugía. * $p \leq 0.05$.

Tabla 9.

Comparaciones *post hoc* de Scheffé, primera cirugía (experimento final).

| Fase | Grupo asignado (I) | Grupo asignado (J) | M | p |
|--------------|--------------------|--------------------|--------|-------|
| Recuperación | Control | Sham | -1.666 | .046* |
| | | SSACC | -2.000 | .037* |
| | SSACC | Control | 1.666 | .046* |
| | | Control | 2.000 | .037* |

Nota: M= media; * $p \leq 0.05$

Aunque descriptivamente, en la Fig. 17 (gráfico de perfil) se puede observar que tras la cirugía, a partir de las 24h, el desempeño de los animales SSACC mejoró conforme transcurrió la evaluación, los resultados del análisis de varianza de medidas repetidas, relativos al efecto del factor *faseval* $F(4)=1.975$, $p=.111$, señalan que no existen diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ensayos correctos en las sesiones experimentales, es decir, la ejecución de los sujetos regresó a línea base.

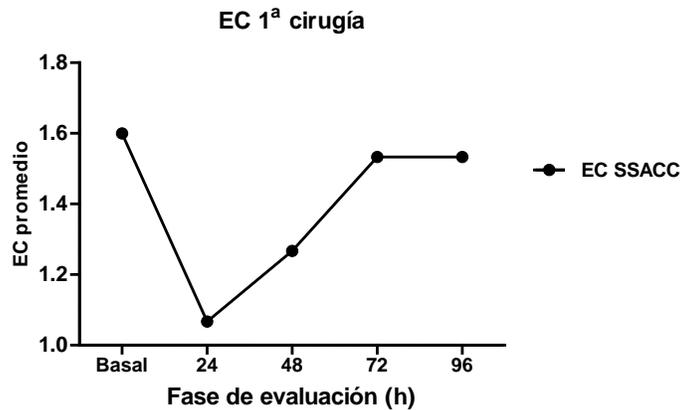


Fig. 17. Gráfico de perfil de la primera cirugía. EC= ensayos correctos.

b) Segunda cirugía

En la Fig. 18 se representan las medias de los ensayos correctos de cada grupo obtenidos en los distintos niveles del factor *faseval*, i. e., de la basal hasta la fase de recuperación. Como se puede apreciar, el promedio del grupo control mejoró en la mayoría de las fases de evaluación; por ejemplo, en la basal obtuvo 2.80 ensayos correctos que disminuyeron a las 24h a 2.40; sin embargo, a las 48h este promedio mejoró (2.70) y se mantuvo hasta el final de la evaluación (96h) donde registró 2.80 ensayos correctos, durante la fase de recuperación, el promedio registrado fue de 2.75 ejecuciones correctas. Respecto al grupo sham, es posible observar fluctuaciones en los promedios obtenidos en cada una de las fases de registro. Por ejemplo, al inicio durante la basal, se registró uno de los dos promedios más altos del grupo, es decir, 2.30 ejecuciones correctas, el otro pico lo alcanzó al final del experimento, esto es, a las 96h con un promedio de 2.40 ensayos correctos. No obstante estos altos promedios entre la basal y las 96h, la ejecución del grupo no fue estable, ya que a las 24h registró un promedio de 1.40 ejecuciones correctas; a las 48h 2.10 pero a las 72h disminuyó a 1.70 ensayos correctos; a pesar del promedio registrado a las 96h, durante la fase de recuperación, se registró un decremento en la ejecución del grupo al realizar 1.66 ensayos correctos. Por último, en la basal el grupo SSACC ejecutó 1.75 ensayos correctos de 3 posibles; a las 24h solo registró 0.75 ensayos correctos; cabe mencionar que la ejecución de este grupo se sostuvo a partir de las 48 y hasta las 96h en 1 ensayo correcto. Es de suma importancia señalar que durante la fase de recuperación no se logró evaluar a los sujetos de este grupo ya que el sujeto que sería evaluado falleció antes

del período establecido. En la Fig. 18, es posible observar cómo la ejecución del grupo control fue estable durante todo el experimento; en el caso del grupo sham a las 24h posteriores a la manipulación de la carótida derecha, el promedio de ensayos correctos registrados disminuyó; sin embargo, en las fases posteriores se observó mejoría en el desempeño de la tarea. Con el grupo isquémico, al igual que en el caso del grupo sham, a las 24h del corte de la carótida derecha el promedio de ensayos correctos fue menor respecto a la basal pero, durante las evaluaciones posteriores (a partir de las 48 y hasta las 96h) el desempeño del grupo mejora y se estabiliza.

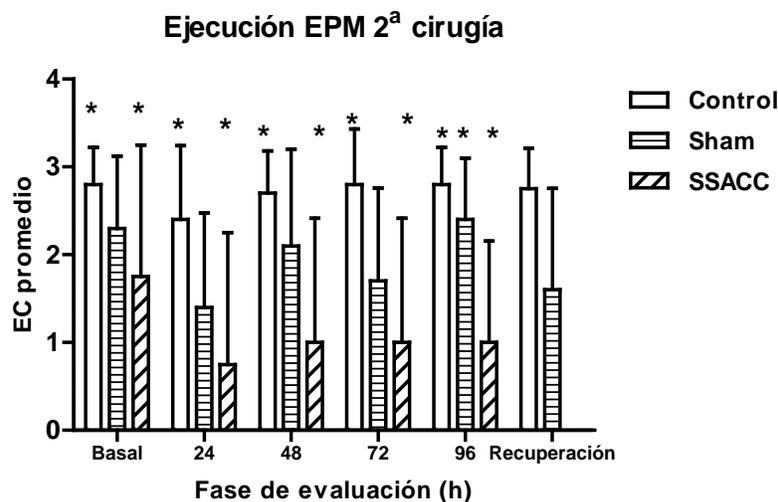


Fig. 18. Ejecuciones promedio y desviación estándar de cada grupo antes y después de la segunda cirugía. EC= ensayos correctos. * $p \leq 0.05$.

El análisis de varianza de una clasificación (Tabla 10) aplicado indicó diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ejecuciones correctas de los grupos experimentales a partir de las 24h post-cirugía y hasta la fase de recuperación, es decir, el procedimiento quirúrgico modificó el desempeño de los sujetos en la tarea. En relación a las diferencias encontradas, la prueba *post hoc* de Scheffé indicó que a las 24, 48, 72 y 96h las diferencias se ubicaron entre el grupo control y el grupo isquémico; sin embargo, a las 96h también existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sham e isquémico (Tabla 1). Cabe indicar que no se mencionan las comparaciones para la fase de recuperación ya que ninguno de los sujetos del grupo isquémico concluyó el experimento hasta este período.

Tabla 10.

Resultados del análisis de varianza aplicado al número de EC, antes y después de seccionar la carótida derecha.

| Fase | F | p |
|--------------|-------|-------|
| Basal | 2.458 | .110 |
| 24h | 4.196 | .029* |
| 48h | 4.605 | .022* |
| 72h | 6.001 | .009* |
| 96h | 9.800 | .001* |
| Recuperación | 5.531 | .043* |

Nota: EC= ensayos correctos. * $p \leq 0.05$.

Tabla 11.

Comparaciones *post hoc* de Scheffé, segunda cirugía.

| Fase | Grupo asignado (I) | Grupo asignado (J) | M | p |
|------|--------------------|--------------------|--------|-------|
| 24h | Control | SSACC | 1.650 | .050* |
| | SSACC | Control | -1.650 | .050* |
| 48h | Control | SSACC | 1.700 | .023* |
| | SSACC | Control | -1.700 | .023* |
| 72h | Control | SSACC | 1.800 | .018* |
| | SSACC | Control | -1.800 | .018* |
| 96h | Control | SSACC | 1.800 | .001* |
| | Sham | SSACC | 1.400 | .009* |
| | SSACC | Control | -1.800 | .001* |
| | | Sham | -1.400 | .009* |

Nota: M= media; 24-96h= períodos de registros posteriores a la segunda cirugía. * $p \leq 0.05$.

Finalmente, al aplicar el análisis de varianza de medidas repetidas los datos fueron inconsistentes, es decir, los supuestos no se cumplieron y el tamaño de la muestra fue insuficiente para lograr resultados que permitieran concluir, por lo cual, en este apartado no se mencionan posibles diferencias en la ejecución de la tarea (promedio de ensayos correctos)

3.2.3 Evaluación conductual

A partir de los resultados obtenidos en el experimento preliminar, se determinó que las conductas previamente mencionadas serían tomadas en cuenta nuevamente para identificar si existían cambios en los patrones conductuales señalados. Es importante mencionar que se realizaron cinco registros observacionales con una duración de 15 min cada uno; los primeros dos registros se sumaron para obtener la frecuencia de la fase *pre-cirugía*, lo mismo se hizo con los dos registros siguientes que se denominaron *post-primera cirugía*, el quinto (y último) registro se tomó en cuenta como *post-segunda cirugía*

a) Primera cirugía

Los resultados de la Fig. 19 indican que durante los registros observacionales relativos a la pre-cirugía, el patrón conductual más frecuente fue sueño, seguido por autocuidado e ingesta de alimento. Durante la fase post-primera cirugía los patrones conductuales más frecuentes fueron los mismos que se registraron durante la fase previa, indicando que no hubo cambios en el despliegue conductual de los sujetos experimentales. Además de los registros realizados en el grupo SSACC, también se llevaron a cabo los registros de los grupos sham y control, los cuales indican que más de la mitad del tiempo total durmieron, por lo que, la frecuencia del resto de las conductas fue muy baja.

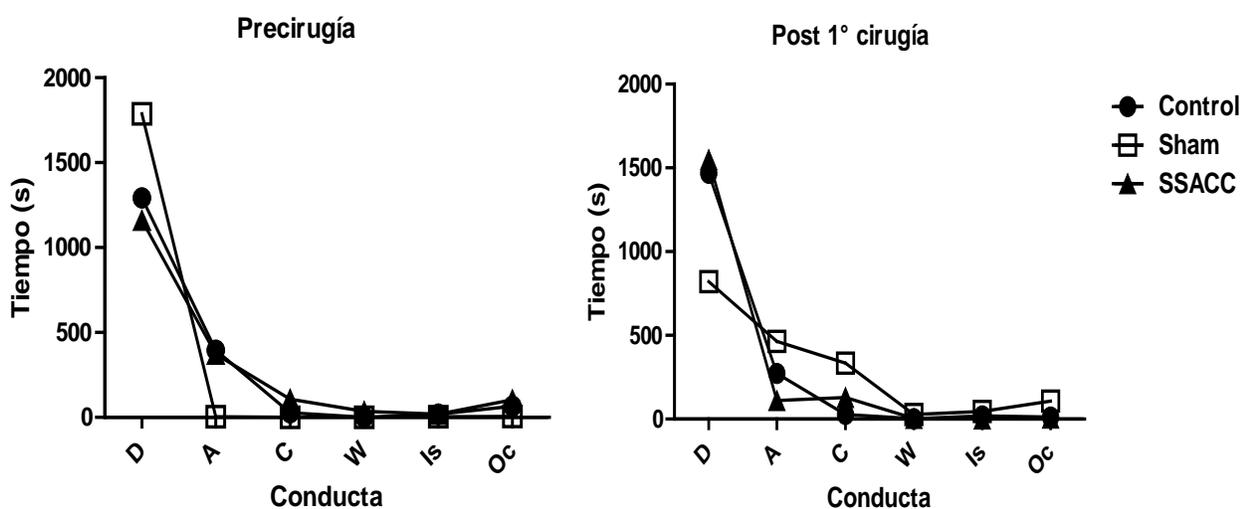


Fig. 19. Tiempo promedio (s) de los patrones conductuales registrados en las fases *precirugía* y *post 1ª cirugía*.

Tabla 12.

Tiempo promedio de los patrones conductuales registrados en la *precirugía*.

| Patrón conductual | Grupo | | |
|-------------------|----------|----------|----------|
| | SSACC | Sham | Control |
| | <i>M</i> | <i>M</i> | <i>M</i> |
| D | 1160.00 | 1786.75 | 1292.25 |
| A | 373.00 | 3.75 | 395.50 |
| C | 107.20 | 0.0 | 27.50 |
| W | 36.20 | 0.0 | 0.0 |
| Is | 19.40 | 4.25 | 18.50 |
| Oc | 104.20 | 5.25 | 66.25 |

Nota: *M*= media, D= sueño, A= autocuidado, C= ingesta de alimento, W= ingesta de agua, Is=interacción social, Oc= otras conductas.

Tabla 13.

Tiempo promedio de los patrones conductuales registrados durante la *post 1ª cirugía*.

| Patrón conductual | Grupo | | |
|-------------------|----------|----------|----------|
| | SSACC | Sham | Control |
| | <i>M</i> | <i>M</i> | <i>M</i> |
| D | 1548.60 | 821.25 | 1467.67 |
| A | 11.20 | 464.00 | 272.00 |
| C | 128.60 | 333.75 | 27.67 |
| W | 4.80 | 28.25 | 67 |
| Is | 0.60 | 45.00 | 19.00 |
| Oc | 6.20 | 107.75 | 12.00 |

Nota: *M*= media, D= sueño, A= autocuidado, C= ingesta de alimento, W= ingesta de agua, Is=interacción social, Oc= otras conductas.

b) Segunda cirugía

Los registros observacionales de esta etapa indican que durante la fase post-primera cirugía, los patrones conductuales más frecuentes (Fig. 20) fueron sueño, ingesta de alimento y autocuidado. En el caso de la evaluación post-segunda cirugía, tras la sección de la carótida derecha, los patrones más frecuentes fueron ingesta de alimento, sueño e ingesta de agua. Adicionalmente, los registros del grupo sham muestran que los sujetos exhibieron patrones conductuales diversos; por ejemplo, en la post-primera cirugía sueño fue el patrón más frecuente seguido por autocuidado e ingesta de alimento; en la fase post-segunda cirugía, la frecuencia del autocuidado disminuyó, el sueño incrementó; mientras que la ingesta de alimento mantuvo tiempos similares a los registrados previamente; además, de exhibir incremento en la frecuencia de la ingesta de agua. Finalmente, en la post-primera cirugía, el patrón más frecuente registrado en el grupo control fue sueño, seguido, con menor frecuencia por autocuidado e ingesta de alimento. Para la post-segunda cirugía (Fig. 20), sueño se mantuvo como el patrón conductual más frecuente e ingesta de alimento como el segundo patrón más exhibido.

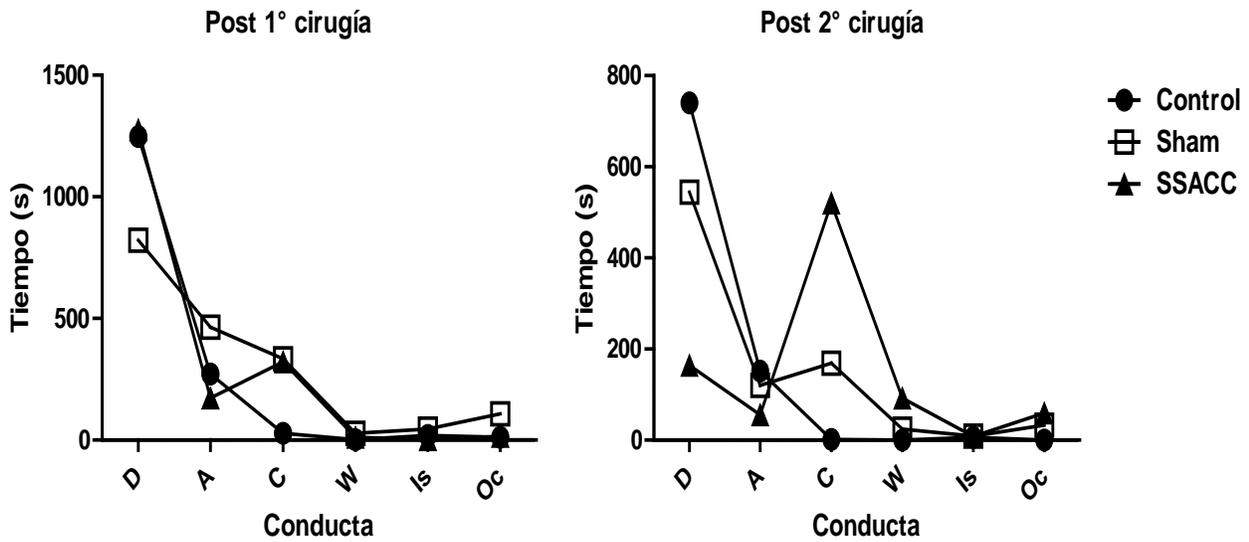


Fig. 20. Tiempo promedio (s) de los patrones conductuales registrados durante la *post 1ª cirugía* y *post 2ª cirugía*.

Tabla 14.

Tiempo promedio de los patrones conductuales registrados durante la *post 1ª cirugía*.

| Patrón conductual | Grupo | | |
|-------------------|----------|----------|----------|
| | SSACC | Sham | Control |
| | <i>M</i> | <i>M</i> | <i>M</i> |
| D | 1276.00 | 821.25 | 1247.67 |
| A | 173.50 | 464.00 | 272.00 |
| C | 321.50 | 333.75 | 27.67 |
| W | 12.00 | 28.25 | 1.67 |
| Is | 1.50 | 45.00 | 19.00 |
| Oc | 15.50 | 107.75 | 12.00 |

Nota: *M*= media, D= sueño, A= autocuidado, C= ingesta de alimento, W= ingesta de agua, Is=interacción social, Oc= otras conductas.

Tabla 15.

Tiempo promedio de los patrones conductuales registrados durante la *post 2ª cirugía*.

| Patrón conductual | Grupo | | |
|-------------------|----------|----------|----------|
| | SSACC | Sham | Control |
| | <i>M</i> | <i>M</i> | <i>M</i> |
| D | 164.00 | 544.50 | 740.66 |
| A | 55.50 | 120.00 | 151.66 |
| C | 520.00 | 169.00 | 1.66 |
| W | 92.50 | 24.50 | 0.0 |
| Is | 8.50 | 9.25 | 6.00 |
| Oc | 59.50 | 32.75 | 0.0 |

Nota: *M*= media, D= sueño, A= autocuidado, C= ingesta de alimento, W= ingesta de agua, Is=interacción social, Oc= otras conductas.

3.2.4 Mortalidad

a) Primera cirugía

Durante la primera cirugía no se registraron muertes en los sujetos del grupo control (n=46), por lo que el porcentaje de sobrevivencia registrado fue de 100% (Fig. 21). En el grupo sham (n=54), al que sólo se le manipuló la carótida, se registró una defunción a las 48h por lo que el porcentaje de sobrevivencia registrado fue 98.14%; a las 72h fue 96.30%; finalmente, a las 96h el porcentaje fue 94.44%. En el grupo SSACC, (n=110) la cirugía modificó la muestra, pues a las 24h el porcentaje de sobrevivencia registrado fue 90%; durante las 48 y 72h no se registraron muertes; no obstante, a las 96h, se registró un deceso, con lo cual el porcentaje de sobrevivencia final fue 88.18%. El análisis estadístico indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las curvas de sobrevivencia de los grupos SSACC y control después de la primera cirugía ($*p \leq 0.05$).

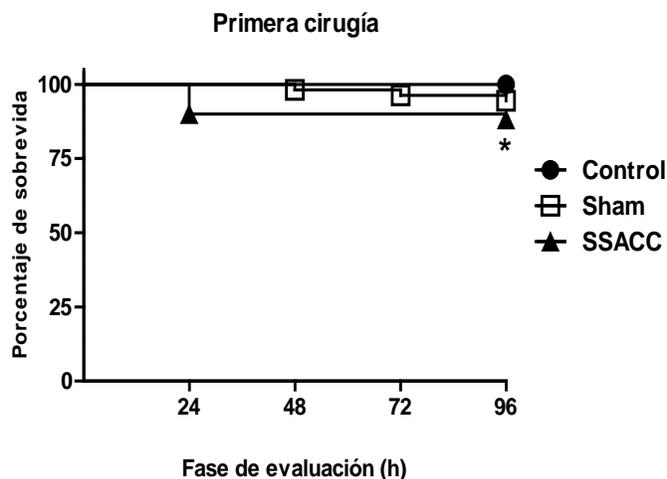


Fig. 21. Curvas de sobrevivencia correspondientes a la primera cirugía. $*p \leq 0.05$.

b) Segunda cirugía

Tras la segunda cirugía, 32 días después de la sección de la carótida izquierda, el número de animales fue el mismo para los grupos sham y control, por lo que el porcentaje de sobrevivencia final (Fig. 22) para el grupo control se consideró como el 100%; sin embargo, en el grupo sham se presentaron dos decesos a las 24h, lo que redujo el porcentaje de sobrevivencia a 95.92% que se mantuvo hasta el final del experimento (96h). El elevado índice de mortalidad del grupo SSACC durante las 24h posteriores a la cirugía redujo el porcentaje de sobrevivencia del grupo a 35.56%; a las 48h el porcentaje registrado fue 26.67% que se mantuvo

así hasta las 96h. El análisis estadístico realizado (la prueba de rangos logarítmicos) indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($*p \leq 0.05$) entre las curvas de sobrevida de los grupos experimentales.

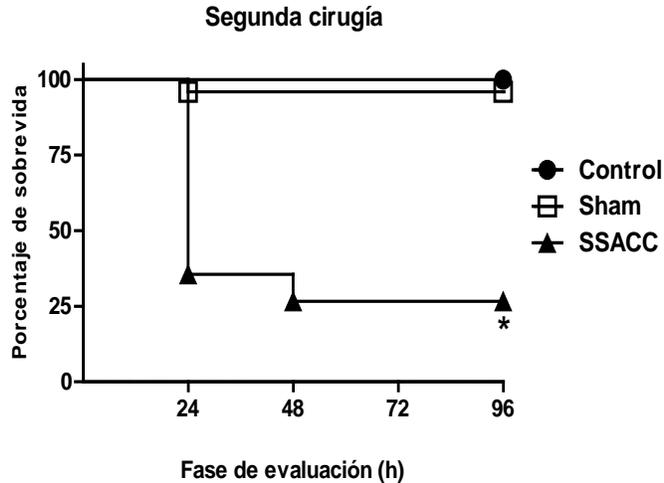


Fig. 22. Curvas de sobrevida correspondientes a la segunda cirugía. $*p \leq 0.05$.

3.2.5 Efecto del dexrazoxano sobre la mortalidad y el déficit cognitivo

Como se puede apreciar en la Fig. 23, la mortalidad del grupo SSACC disminuyó en los sujetos a los que se les administró fármaco a dosis baja (32 mg/kg; n=45) y dosis alta (128 mg/kg; n=44) comparados con los sujetos del grupo tratado con solución salina, quince minutos después de la sección de la carótida derecha. El mayor número de muertes se registró 24h después de la cirugía. Cabe señalar que sólo en los grupos dosis baja y solución salina se registraron muertes a las 48h; por otro lado, es importante mencionar que a las 72h no se presentó muerte alguna en los grupos administrados con fármaco o solución salina. Los porcentajes de sobrevida correspondientes al grupo vehículo fueron 37.5% a las 24h y 16.67% a las 48h, este porcentaje de sobrevida se mantuvo hasta las 96h. Para el grupo tratado a dosis baja, los porcentajes fueron 34.29% a las 24h y 25.71% de las 48h y hasta las 96h. Por otra parte, para el grupo que recibió la dosis alta del fármaco, el porcentaje de sobrevida a las 24h fue 35.48%, mientras que a partir de las 48 y hasta las 96h el porcentaje registrado fue 35.48%, al no registrarse decesos en estos períodos de registro. A pesar de la reducción observada en los índices de mortalidad en los grupos dosis baja y alta, la prueba de rangos logarítmicos no encontró diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas de sobrevida.

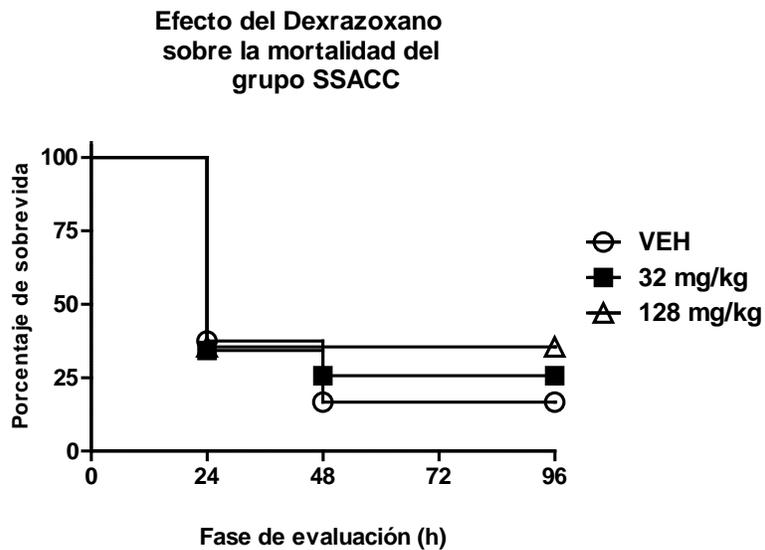


Fig. 24. Curvas de sobrevivida de los subgrupos SSACC, cada curva representa a los animales tratados con dosis baja (32 mg/kg) y dosis alta (128 mg/kg) de dexrazoxano o solución salina (VEH) quince minutos después de la sección de la carótida derecha.

Por otra parte, el análisis estadístico propuesto para la comparación del promedio de ensayos correctos de los subgrupos SSACC aun cuando se corrió, los resultados no se muestran ya que estos no fueron consistentes. En cambio, en la Tabla 10, se muestra el número de ensayos correctos de los animales bajo tratamiento. Cabe mencionar que para conocer qué tanto influyó el tamaño de la muestra en las fases de evaluación no significativas, se llevó a cabo la Prueba del Efecto (Rosenthal y Rosnow, 1991; Tabla 11), utilizando la siguiente fórmula:

$$d = 2(t) / \sqrt{g}$$

Donde:

d= tamaño del efecto

t= valor de t

g/= grados de libertad

Los valores absolutos tienen el siguiente tamaño del efecto:

$d \geq .80 \rightarrow$ efecto grande

$d = .50 \rightarrow$ efecto medio

$d \leq .20 \rightarrow$ efecto pequeño

Tabla 16.

Ensayos correctos de los grupos tratados a dosis baja (32 mg/kg) y alta (128 mg/kg) de dexrazoxano.

| Grupo | Sujeto | Basal | 24h | 48h | 72h | 96h |
|-----------|--------|-------|-----|-----|-----|-----|
| 32 mg/kg | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| 128 mg/kg | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota: 24-96h= periodos posteriores a la sección de la carótida derecha (segunda cirugía).

Tabla 17.

Análisis del tamaño del efecto (d) en las fases de evaluación que no resultaron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

| Fase | d | Efecto |
|-------|-------|---------|
| Basal | .945 | Grande |
| 24h | -.5 | Pequeño |
| 48h | -.756 | Pequeño |
| 72h | -.756 | Pequeño |
| 96h | -1 | Pequeño |

Nota: d = valor tamaño del efecto.

Los resultados, al aplicar la prueba del efecto, indican que incrementar el tamaño de la muestra tiene un efecto grande únicamente para la fase basal, es decir, no se observan cambios si se incrementara el tamaño de la muestra en las fases posteriores a la sección de la carótida derecha.

3.2.6 Análisis histológico

La coloración que adquirieron los cortes coronales realizados a los cerebros de los animales de los grupos experimentales, permitió la identificación, delimitación y diferenciación del tejido sano del tejido isquémico, al reaccionar el TTC con las mitocondrias vivas de las neuronas, mediante el uso del programa Pro-image (Fig. 25). En el caso del grupo control ($n=6$), el volumen total de los cerebros extraídos no se modificó a lo largo de la evaluación, es decir, a partir de la basal y hasta las 96h. Respecto al porcentaje de la zona de infarto, los resultados obtenidos indican que los porcentajes registrados fueron mínimos (menos del 1% del volumen tisular total). Por otra parte, en el caso del grupo sham ($n=6$), a partir de las 24 y hasta las 72h se observó un incremento en el volumen total del tejido; sin embargo, a las 96h los resultados indicaron una disminución del volumen del tejido examinado. En relación al porcentaje tisular de infarto, los resultados son contradictorios, pues durante la basal se registró el mayor porcentaje de tejido dañado, es decir, 4.23%; a partir de las 24h y hasta finalizar el período de evaluación, este porcentaje se redujo,

registrando 1.08% de tejido dañado. Finalmente, en el grupo isquémico a las 24 y 48h se registró un volumen menor al obtenido durante la basal; en cambio, a las 72h el volumen tisular incrementó pero a las 96h se observó nuevamente reducción del tejido cerebral dañado bajo estudio. El porcentaje de las zonas de infarto obtenido durante la basal fue de 1.57%; a las 24h el porcentaje previamente registrado incrementó a 2%; a las 48h el porcentaje disminuyó a 1.3%, pero a las 72h se registró un porcentaje de 2.59%, que mostró disminución a las 96h al registrar 2.26% de tejido isquémico producto de la sección secuencial de las carótidas. Las áreas de infarto que presentaron lesión con mayor incidencia fueron la corteza cerebral, el hipocampo, el putamen, el cerebelo y el tallo cerebral.

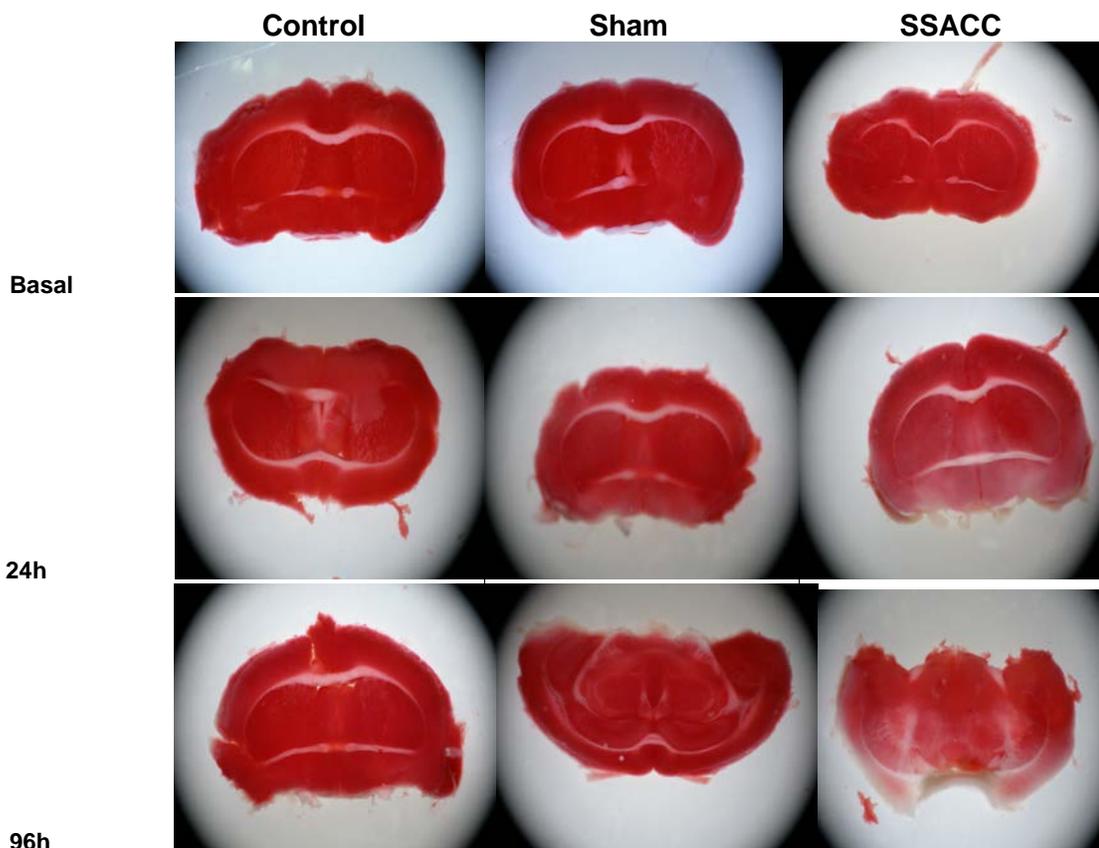


Fig. 9. Cortes coronales de los animales control, sham e isquémicos durante la fase basal, 24h y 96h.

Fuente: elaboración propia, agradecemos las facilidades otorgadas por el Laboratorio de Neuroanatomía funcional de la Facultad de Medicina, UNAM.

IV. DISCUSIÓN

El hallazgo más importante de este trabajo es la demostración de que el modelo del laberinto elevado en cruz (EPM) es una herramienta útil en la identificación y caracterización de las alteraciones en la ejecución y el recuerdo inducidas por la isquemia cerebral aguda, ya que el uso conjunto de parámetros conductuales y de la función motora y cognitiva permitió la detección de estadios críticos posteriores a la cirugía, así como la necesidad de incorporar información relativa al despliegue conductual de los sujetos dentro del ambiente experimental para evaluar el desempeño de los animales integralmente. Esta integración permitió identificar alteraciones motoras, vía el desplazamiento de los animales de un punto a otro dentro del laberinto y así, diferenciar si se trataba de compromiso motor o de déficit cognitivo al ejecutar la tarea. Ya que no existe en la literatura ningún reporte que sugiera el uso del promedio de ensayos correctos como medida de aprendizaje y memoria en el EPM, es importante señalar que este trabajo es la primera propuesta de evaluación del paradigma descrito en la metodología. Por ello, es primordial indicar que a diferencia de los trabajos referentes al estudio de ansiedad o aprendizaje que registran el porcentaje de ingreso a los brazos cerrados, el porcentaje de permanencia o ingreso a los brazos abiertos, la conducta no exploratoria (permanencia del sujeto en los brazos acicalándose únicamente) o la latencia de transferencia, entre otros parámetros, en este trabajo se decidió establecer como medida del déficit cognitivo la disminución del número de ejecuciones correctas en cada sesión experimental. Es decir, de tres ensayos que formaron una sesión experimental, si el número de ensayos correctos era menor conforme transcurrían las fases de evaluación se infería que los animales no aprendieron las reglas generales de la tarea (fase de adquisición), al comparar los resultados con la fase basal y se podía asumir que para la fase de recuperación existía déficit en memoria de referencia si los sujetos no ejecutaban adecuadamente la tarea, esto es, el promedio era menor que el obtenido durante la fase de adquisición. En la presente investigación sólo se registraron ciertos patrones conductuales más no los porcentajes como habitualmente se hace, la aportación de estos registros fue importante ya que permitieron identificar alteraciones en el desplazamiento de los sujetos, consecuencia de la isquemia cerebral o ansiedad, en el grupo control. Los resultados de los registros conductuales señalan que las conductas más frecuentes fueron el ingreso a los brazos cerrados, particularmente, el ingreso al brazo no reforzado fue el que presentó una frecuencia superior

frente al ingreso al brazo reforzado. Las conductas que siguieron al ingreso a los brazos cerrados fueron la permanencia en el brazo de salida y la conducta no exploratoria, además de la exploración de los brazos abiertos. Es importante indicar que este análisis es la compilación de las primeras dos sesiones de entrenamiento del experimento final (previo a la primera cirugía). En el caso de la segunda cirugía, los registros mostraron que las conductas observadas con mayor frecuencia fueron ingreso a los brazos cerrados; en esta ocasión, el ingreso al brazo reforzado mostró incremento en su frecuencia. La segunda conducta más frecuente fue la exploración de los brazos abiertos, a diferencia de la primera cirugía donde la frecuencia de la conducta no exploratoria y la permanencia en el brazo de salida que mostraron alta frecuencia durante la primera cirugía, en esta fase esa frecuencia se redujo. Estos resultados sugieren que los niveles de ansiedad observados durante la primera parte del experimento disminuyeron, uno de los factores pudo ser la re-exposición continua al laberinto y el aprendizaje de la asociación entre el reforzador y el brazo cerrado correspondiente y posiblemente también por procesos de habituación en los animales, tal como lo sugieren Carobrez & Bertoglio (2005), Milot & Plamondon (2009) y Rodgers et al., (1996). No obstante, para corroborar estos resultados es importante apuntar que la relación R^+ - BR^+ puede no ser la única relación que los animales aprendieron, pues, algunos autores sugieren (Lister, 1987; Pellow et al., 1985) que debido a la aversión natural de los roedores por los espacios abiertos y elevados evocada en los animales por el EPM, los brazos cerrados serían espacios seguros para ellos, lo cual podría favorecer el ingreso de los animales a los brazos cerrados.

En relación al estudio del déficit cognitivo inducido por la isquemia cerebral aguda es necesario resaltar que la integración de información inherente a los patrones conductuales de los sujetos dentro y fuera del ambiente experimental, es de suma importancia ya que permite la identificación de cambios sutiles en las conductas que son imprescindibles para la sobrevivencia de los organismos en ambientes naturales (Carobrez & Bertoglio, 2005). Por ello, además de los resultados obtenidos en la ejecución de la tarea, se registraron los patrones conductuales exhibidos con mayor frecuencia durante las sesiones experimentales. Es decir, además de registrar el número de ensayos correctos y la latencia de transferencia, se registró la forma en que los sujetos se desplazaron dentro del laberinto y si permanecían

en el brazo de salida o lo exploraban, así como las conductas que los animales exhibieron en cada uno de los ensayos.

El registro de los patrones conductuales mostró pocos cambios en el despliegue conductual de los sujetos del grupo SSACC antes y después de la cirugía, i. e., a pesar del reducido despliegue conductual observado dentro de las cajas habitación, la inducción de isquemia cerebral podría no ser el único factor que esté influyendo en la conducta manifestada por los ratones. Uno de los factores que podría tener influencia en los resultados, es la hora a la cual se realizaron los registros observacionales ya que éstos se efectuaron por la tarde, cuando la mayoría de los animales dormía, además de las fases en las cuales se llevaron a cabo ya que las observaciones posteriores a la cirugía se hicieron algunos días después de la misma; el tamaño de la muestra también pudo influir pues como se mencionó, el registro se realizó únicamente con siete sujetos del grupo isquémico que con el paso del tiempo, después de la segunda cirugía, disminuyó como consecuencia de la sección de la carótida derecha. No obstante, es importante recordar que al evaluar a los animales en la tarea dentro del laberinto se observaron alteraciones motoras en los sujetos isquémicos que les impidieron desplazarse normalmente, aun cuando durante las sesiones de entrenamiento y la basal no mostraron dificultad. Es primordial señalar que con el paso del tiempo se observó una disminución en dichas alteraciones motoras, sobre todo después de los períodos críticos posteriores a cada cirugía, lo que sugiere que esas alteraciones pueden ser tiempo-dependientes tal como lo observaron Milot & Plamondon en 2009, al evaluar la actividad locomotora y los componentes emocionales (ansiedad) en ratas después de la inducción de isquemia cerebral y el período de reperfusión en el laberinto elevado en cruz y la prueba de campo abierto. En este estudio, los registros se realizaron 1, 5, 15 y 30 días después del período de reperfusión. Los resultados señalan que los cambios observados en ansiedad y la actividad locomotora son tiempo dependientes. Por ejemplo, los niveles de ansiedad del día 1 post-reperfusión incrementaron comparados con los observados en los animales sham; el día 5 registraron una reducción en ansiedad, mientras que a los 15 y 30 días post-reperfusión, los niveles de ansiedad fueron iguales a la basal. En relación a la actividad locomotora, se observaron cambios similares, es decir, los días 1, 5 y 30 post-reperfusión hubo incrementos en la actividad locomotora; pero, durante el día 15 registraron inhibición de dicha conducta.

Una de las ventajas del experimento preliminar fue, sin duda, la detección de la necesidad de implementar criterios que permitieran identificar si los sujetos aprendían la tarea y si su conducta implicaba mecanismos de memoria en la fase de recuperación. Los resultados del experimento preliminar señalan que la inducción de un primer evento de isquemia cerebral no produce cambios significativos en la ejecución de los animales. De hecho, la evaluación del período inter-cirugías también indica que no hay cambios en la ejecución de los grupos experimentales, es decir, a pesar de la hipoperfusión inducida en los animales isquémicos por la sección de la arteria carótida izquierda, a través del tiempo podrían estar involucrados mecanismos reparadores que favorecen la recuperación del tejido dañado en la restauración del flujo sanguíneo, como lo es la participación del polígono de Willis (Rodríguez, Rodríguez-Boscan et al., 2000). Sin embargo, la inducción de un segundo evento isquémico tuvo un efecto importante en la ejecución de la tarea por parte de los sujetos del grupo SSACC, ya que su desempeño disminuyó, en comparación con el grupo sham.

Algunas de las modificaciones realizadas en el experimento definitivo fueron la reducción del tiempo de evaluación durante el entrenamiento, por ejemplo, de 8 min se redujo a sólo 3 min el período de observación, ya que como Rodgers et al. (1996) señalan, incrementar el tiempo de evaluación por más de 5 min durante la primera exposición al laberinto, no alterará la conducta de los sujetos las sesiones posteriores (re-exposición, en las sesiones estándar de la tarea). Bajo este señalamiento, se establecieron ciertos criterios para que los sujetos pudieran formar parte de las muestras de cada fase del experimento. Por ejemplo, en el experimento preliminar se determinó que si los animales probaban frecuentemente el reforzador, habían aprendido a ubicarlo dentro de los brazos cerrados; sin embargo, para el experimento final, este criterio se modificó hasta determinar que si durante las dos últimas sesiones del entrenamiento, donde se registraron tres ensayos por sesión, los animales lograban el 50% de ensayos correctos, entonces formarían parte de la siguiente fase (adquisición), ya que alcanzar el porcentaje mínimo, sugería que los animales aprendieron la tarea. Posterior a esta fase, se registró la conducta basal para contar con un período de referencia previo a la cirugía y así poder estudiar el desempeño posterior al corte (grupo SSACC) o manipulación (grupo sham) de las carótidas. Para identificar si los animales aprendieron la tarea se estableció un segundo criterio, para la fase de evaluación post-

cirugía (adquisición), es decir, lograr el 85% de ensayos correctos durante esta etapa permitía asumir que si los animales lograban este criterio los animales aprendieron satisfactoriamente las reglas generales de la tarea, para lo cual serían evaluados en la fase de recuperación para determinar si recordaban esas reglas. Este criterio, pudo ayudar a discriminar mejor a los animales que aprendieron la tarea de aquellos que no lo hicieron.

A pesar de la implementación de nuevos criterios para el experimento final, los resultados encontrados indican que a las 48h existen diferencias en las medias de ejecución de los grupos experimentales; sin embargo, las comparaciones *post hoc* no arrojaron diferencias evidentes entre los grupos. No obstante, las diferencias más claras se ubican en la fase de recuperación, entre el grupo SSACC y los grupos control. Cabe mencionar que estos resultados se pueden atribuir al número de sujetos del grupo isquémico evaluados en esta fase, ya que, comparado con los otros dos grupos, fueron pocos los animales isquémicos que lograron el criterio establecido, ya que como se mencionó en la sección de resultados, este grupo obtuvo un promedio de 3 ensayos correctos, siendo el mejor grupo de la evaluación. Pero, al no encontrar diferencias estadísticamente significativas en las otras fases de evaluación se puede asumir la participación de mecanismos reguladores de daño tisular tras la inducción de isquemia cerebral, pues como se mencionó, las alteraciones motoras observadas se redujeron con el paso del tiempo favoreciendo la recuperación de los animales del grupo isquémico. Lo anterior sugiere que la inducción del primer infarto podría generar mecanismos de pre-condicionamiento isquémico (Takeda et al., 2003), así como la simulación de lo que sucede a nivel clínico, donde, un primer infarto habitualmente no deja secuelas graves y puede pasar desapercibido no sólo por el paciente sino también por quienes le rodean. En relación, a los resultados de la ejecución de los animales en la segunda cirugía, éstos indican que a partir de las 24h y hasta las 96h se observan diferencias significativas en la ejecución del grupo control y el grupo isquémico, es decir, la sección de la carótida derecha resulta en un deterioro mayor al observado tras la primera cirugía. Para el caso de la fase de recuperación no se observan diferencias estadísticamente significativas ya que no fue posible evaluar a los animales del grupo isquémico pues no sobrevivieron hasta esta etapa del experimento. Aunque la ejecución del grupo SSACC no iguala lo observado en el grupo control, es posible observar cómo ésta mejora a través del tiempo.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue la identificación de períodos críticos posteriores a la cirugía (únicamente en el grupo SSACC); sin embargo, no fue posible lograrlo en ambos experimentos. Por ejemplo, en el experimento preliminar, el análisis de varianza de medidas repetidas no encontró diferencias significativas para la primera cirugía, esto es, la ejecución del grupo isquémico fue la misma en cada una de las fases de evaluación. Para la segunda cirugía no fue posible analizar los resultados del análisis ya que éstos fueron inconsistentes, uno de los factores que pudo influir fue el tamaño de la muestra, ya que como se mencionó, los índices de sobrevida se modificaron como consecuencia de la sección de la carótida derecha. Al igual que en el experimento preliminar, durante el experimento final, el análisis estadístico de la primera cirugía, no reveló diferencias estadísticamente significativas; y ya que la muestra de sujetos evaluada desde la basal hasta las 96h fue muy pequeña en el caso de la segunda cirugía, los datos obtenidos no permitieron llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente.

Los resultados relativos a la evaluación de la eficacia del dexrazoxano en la disminución del déficit cognitivo y el porcentaje de sobrevida indican que no existen diferencias significativas en la ejecución de los grupos administrados a dosis baja (32 mg/kg) y dosis alta (128 mg/kg) de dexrazoxano, i. e., la ejecución es la misma durante las fases posteriores a la segunda cirugía para los grupos dosis baja y alta con quienes se realizó la comparación. Es decir, el fármaco posee propiedades neuroprotectoras al emplearse como tratamiento farmacológico en el estudio de las alteraciones inducidas por la isquemia cerebral sin observarse diferencias relacionadas con la dosis aplicada. No obstante, es importante realizar más evaluaciones para determinar si existe relación entre la dosis administrada y el porcentaje de sobrevida, así como la reducción del daño tisular. Con el objetivo de evaluar el impacto que tendría incrementar el tamaño de la muestra para conocer si se encontrarían diferencias entre los grupos en las fases de evaluación posteriores a la segunda cirugía, se llevó a cabo la prueba del efecto, cuyos resultados indicaron que la única fase en la cual se observarían diferencias estadísticamente al incrementar el tamaño de la muestra sería durante la basal y, aunque se sugiere que hacerlo en el resto de las fases de evaluación tendría un efecto pequeño, se sugiere tomar con cautela estos resultados ya que el análisis histológico, por ejemplo, sugiere que existen ciertos períodos en los cuales es posible observar reducción del tejido isquémico. Por otra parte, si se analizan caso por caso los

resultados de los animales tratados, es posible observar que el número de ejecuciones correctas del sujeto del grupo dosis baja no mejoró tras la segunda cirugía. En cambio, de los 3 animales del grupo 128 m/kg, en dos de ellos fue posible identificar mejoría en su desempeño; uno de los animales ejecutó 3 ensayos correctos en la basal, de hecho, su ejecución se mantuvo estable hasta las 72h; el otro sujeto, mejoró hasta las 48h su registro, finalizando el experimento con 2 ensayos correctos, es decir, un promedio mayor que en las otras fases. Respecto a las curvas de sobrevivencia, de manera descriptiva se observó que el fármaco redujo el número de muertes registradas tras la sección de la carótida derecha; no obstante, el análisis estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas, por lo que se sugiere continuar con el estudio del efecto neuroprotector del dexrazoxano.

Al realizar el análisis histológico, se observaron algunos cambios. Por ejemplo, a las 24 y 48h los cerebros estudiados registraron un menor volumen de tejido respecto al análisis basal; sin embargo, a las 72h el volumen registrado fue mayor. Respecto al porcentaje de la zona de infarto, los resultados señalan que en la basal el porcentaje fue 1.57%; a las 24h 2%; 1.35 a las 48h; 2.59% a las 72h y 2.29% a las 96h; estos cambios podrían ser producto de los mecanismos necróticos, apoptóticos, la producción de radicales libres y de inflamación tisular consecuencia de la isquemia cerebral, ya que como se sabe, estos eventos están íntimamente relacionados. Por otra parte, la reducción del tejido isquémico puede ser explicada por el papel que juega el dexrazoxano en la isquemia cerebral, es decir, la reducción sugiere que la producción de radicales libres es menor posterior al tratamiento farmacológico; sin embargo, para evaluar de forma más puntual el efecto del fármaco, es necesario emplear una técnica histológica más sensible, ya que el colorante empleado (TTC) reacciona con las mitocondrias vivas y el tiempo entre la extracción del cerebro y la colocación de este en el colorante puede demorar unos minutos, lo que podría influenciar los resultados obtenidos. Es importante señalar que a pesar de los posibles mecanismos reparadores tras la primera cirugía, la hipoperfusión inducida en los sujetos isquémicos juega un papel importante, ya que se observaron alteraciones motoras (no tan importantes como las registradas en la segunda cirugía) e incluso, la muerte de los sujetos que no lograron recuperarse.

V. CONCLUSIONES

Una de las aportaciones más importantes del presente trabajo fue la demostración de que el EPM es una herramienta útil para evaluar y describir las alteraciones en la ejecución (aprendizaje) y el recuerdo (memoria) de una tarea, inducidas por la isquemia cerebral aguda; además de la descripción e integración de información relacionada con los patrones conductuales inherentes a los animales dentro y fuera del ambiente experimental, con el objetivo de detectar si se trataba de déficit cognitivo o compromiso motor en los animales sujetos a la SSACC.

De las hipótesis planteadas, es importante señalar la comprobación de que la isquemia cerebral inducida por la SSACC produce déficits en aprendizaje (ejecución) y memoria (recuerdo) que son posibles de evaluar mediante el número de ensayos correctos, que en el caso del grupo isquémico el promedio de ejecuciones correctas fue menor que en los otros grupos experimentales. También fue posible observar que a través del tiempo, los animales isquémicos mostraron recuperación, pues su desempeño en la tarea mejoró, incluido el compromiso motor observado. Sin embargo, no fue posible corroborar si la sección de las carótidas modificó los patrones conductuales evaluados al no observarse cambios sustanciales en estos. Finalmente, es imprescindible mencionar que la integración de información relacionada con el desplazamiento de los animales dentro del laberinto favoreció la detección del déficit cognitivo, ya que fue posible notar que aun cuando la latencia de transferencia incrementaba, los animales eran capaces de completar la tarea en la mayoría de los casos. Es decir, si se estudian conjuntamente el promedio de ensayos correctos y la latencia de transferencia brindan más información sobre el desempeño de la tarea que si se evalúan de forma aislada, en el caso de las alteraciones inducidas por la isquemia cerebral particularmente, ya que no siempre el registro de tiempos cercanos al límite establecido indica que los animales no recuerden o no hayan aprendido las reglas de la tarea.

En relación a los objetivos generales, éstos se cumplieron pues, por un lado fue posible identificar y evaluar las alteraciones en aprendizaje (ejecución) y memoria (recuerdo) inducidas por la isquemia cerebral gracias al experimento preliminar, además de la posibilidad de evaluar el efecto neuroprotector del dexrazoxano no sólo en la reducción de las zonas de infarto sino al tomar en cuenta el porcentaje de sobrevida y la recuperación funcional de los sujetos mediante la tarea propuesta. Finalmente, de los objetivos específicos

fue posible cumplir con el estudio del efecto de la administración de dos dosis del fármaco en estudio, gracias al análisis histológico que indicó reducción del tejido isquémico en los animales tratados comparados con los grupos sham o control, además de la reducción de las alteraciones motoras y el déficit cognitivo, al favorecer el incremento del número de ensayos correctos y la sobrevivencia de los sujetos tras la segunda cirugía (sección de la carótida derecha).

5.1 Limitaciones

A continuación se enlistan las principales limitaciones de la presente investigación:

- a) *El tamaño de la muestra.* Debido al elevado índice de mortalidad registrado tras la segunda cirugía, la prueba del efecto permitió detectar que si el tamaño de la muestra incrementa durante la basal se observarían diferencias estadísticamente significativas en el promedio de ejecuciones correctas de los grupos experimentales.
- b) *Tiempo.* Es decir, ya que en promedio el tiempo empleado para evaluar a cada sujeto es de 5-8 min, el incremento en el tamaño de la muestra incrementaría el tiempo total de evaluación en función del número de sujetos experimentales empleados.
- c) *Evaluación de la lesión isquémica.* Para corroborar y brindar mayor información sobre los mecanismos de reparación cerebral, se sugiere emplear técnicas más sensibles que permitan identificar y cuantificar con mayor precisión las zonas de infarto.

5.2 Sugerencias

- 1) Realizar la evaluación conductual 60 min, 2, 24 y 48h posteriores a la cirugía para determinar si existen cambios más sutiles en los patrones conductuales registrados en este trabajo que puedan brindar mayor información.
- 2) Incrementar el tamaño de muestra requerido para llevar a cabo la evaluación del despliegue conductual de los animales.
- 3) Analizar diferencialmente los cerebros extraídos de los animales isquémicos, es decir, llevar a cabo una comparación no sólo descriptiva sino también

cuantitativa de los cerebros de los animales tratados con fármaco o solución salina, así como el uso de una técnica más sensible capaz de discriminar el tejido isquémico del sano.

- 4) Realizar más estudios con los parámetros sugeridos en el presente trabajo para determinar la utilidad del modelo.
- 5) Adicionalmente a las sugerencias realizadas, se propone la elaboración de un modelo computacional que integre los resultados obtenidos en este trabajo y precedentes para evaluar el comportamiento de las curvas de supervivencia de los animales y establecer previamente, tamaños de muestra que permitan anticipar la muerte de los animales isquémicos y así, poder analizar los datos de la segunda cirugía para obtener información relacionada con el fenómeno de estudio y su modificación a través del tiempo.

VI. REFERENCIAS

- 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 Update. Dallas: American Heart Association.
- Anderson, V. L., & McLean, R. A. (1974). *Design of experiments. A realistic approach*. USA: Marcell Dekker.
- Andreatini, R. & Bacellar, L. F. S. (2000). Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 24, 549-560.
- Arango-Davila, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez y Pimienta-Jiménez, H. (2004). Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Revista de Neurología*, 39(2), 156-165.
- Astrup, J., Siesjö, B. K., & Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-725.
- Auer, R., Jensen, M. L., & Wishaw, I. Q. (1989). Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 9(5), 1541-1647.
- Back, T. (1999). Pathophysiology of the ischemic penumbra-revision of a concept. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 18(6), 621-638.
- Back, T., Hemmen, T., & Schüler, O. (2004). Lesion evolution in cerebral ischemia. *Journal of Neurology*, 251, 388-397.
- Baumlin, K. M. & Richardson, L. D. (1997). Stroke syndromes. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 15, 551-561.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., & Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17, 472-476.
- Belayev, L., Zhao, W., Busto, R., & Ginsberg, M. D. (1997). Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture, I: three-dimensional autoradio-graphic image-analysis of focal cerebral metabolism blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17, 1266-1280.
- Block, F. (1999). Global ischemia and behavioural deficits. *Progress in Neurobiology*, 58, 279-295.

- Bradberry, J. & Phrarm, D. (1993). Stroke. En J. Dipiro, R. Talbert, G. Yee, G. Matzke, B. Wells & M. Posey (Eds.). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach* (pp. 435-458). USA: Appleton & Lance.
- Cabrera, F. (2009). Evaluando memoria de trabajo y de referencia en hámsteres dorados (*Mesocricetus Auratus*): una tarea de memoria espacial. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 35, 117-132.
- Campbell, D. T. y Stanley, J. C. (1973). *Diseños experimentales y cuasiexperimentales en la investigación social*. Buenos Aires: Amorrortu.
- Caplan, L. R., & Hon, F. K. S. (2004). Clinical diagnosis of patients with cerebrovascular disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 31, 95-109.
- Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 29, 1193-1205.
- Castillo, J. (2000). Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Revista de Neurología*, 30(5), 459-464.
- Castillo, J., Álvarez-Sabin, J., Dávalos, A., Díez-Tejedor, Lizasoain, I., Martínez-Vila, E... Zarranz, J. J. (2003). Revisión de consenso. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Neurología*, 18(7), 368-384.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., & Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 841-852.
- Corbett, D. & Nurse, S. (1998). The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Progress in Neurobiology*, 54, 531-548.
- Culmsee, C. & Krieglstein, J. (2005). Mechanisms of neuronal degeneration after ischemic stroke-emerging targets for novel therapeutic strategies. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2, 463-469.
- de Vries, A. C., Nelson, R. J., Traystman, R. J., & Hurn, P. D. (2001). Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 25, 325-342.
- de Keyser, J., Sulter, G., & Luiten, P. G. (1999). Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends in Neuroscience*, 22, 535-540.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neuroscience*, 22, 391-397.

- Domjan, M. (2003). *Principios de aprendizaje y conducta*. México: International Thompson Editores.
- Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, *55*, 310-318.
- Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, *28*, 699-709.
- 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.
- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Journal of Behavioral Data. Behavior Brain Research*, *37*, 47-59.
- Endres, M. & Dirnagl, U. (2002). Ischemia and stroke. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 455-473.
- Ferster, C. B. & Carol, M. (1975). *Principios de la conducta*. México: Trillas.
- Frussa-Filho, R., Otoboni, J. R., Uema, F. T., & Sá-Rocha, L. C. (1991). Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze: effects of age and isolation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *24*(7), 725-728.
- Fuentes-Vargas, M., Santiago-Mejia, J., Pinzon, E., & Rodriguez, R. (2002). Age-related susceptibility to brain ischemia in mice. *Drug Development Research*, *57*, 161-166.
- Futrell, N. & Millikan, C. H. (1996). Stroke is an emergency. *Disease-a-Month*, XLII (4), 199-264.
- Gerlai, R. (1996). A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. *Behavioral Brain Research*, *95*, 91-101.
- Ginsberg, M. D. (2003). Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection. *Stroke*, *34*, 214-223.
- Gómez, C., Santiago-Mejia, J., Ventura-Martinez, R., & Rodriguez, R. (2006). The sunflower seed test: a simple procedure to evaluate forelimb motor dysfunction after brain ischemia. *Drug Development Research*, *67*, 752-756.
- Gorelick, P. B. (1994). Stroke prevention. An opportunity for efficient utilization of health care resources during the coming decade. *Stroke*, *25*, 220-224.

- Green, A. R., Odergren, T., & Ashwood, T. (2003). Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(8), 402-408.
- Grubb, N. R., Fox, K. A., Smith, K., Best, J. Blane, A., Ebmeier, K. P... O'Carrol, R. E. (2000). Memory impairment in out-of-hospital cardiac arrest survivors is associated with global reduction in brain volume, not focal hippocampal injury. *Stroke*, 1509-15414.
- Guevara, M. G., Rodriguez, R., Álvarez, A. L., Riaño, A. M. y Rodríguez, P. C. R. (2004). Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Revista Cubana de Medicina*, 43(4).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (pp. 19-32). Oxford: Oxford University Press.
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1-5.
- Hazell, A. S. (2007). Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochemistry International*, 50 (7-8), 941-953.
- Hossmann, K. A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(7/8), 1057-1083.
- Hossmann, K. A. (2008). Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*, 55, 257-270.
- Hunter, A. J., Green, A. R., & Cross, A. J. (1995). Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends in Pharmacological Sciences*, 16, 123-128.
- Hunter, A. J., Mackay, K. B., & Rogers, D. C. (1998). To what extent have functional studies of ischaemia in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends in Pharmacological Sciences*, 19, 59-66.
- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía [INNyN] (2010). <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/evascularcerebral.html>. Recuperado en septiembre del 2010.
- Itoh, J., Nabeshima, T., & Kameyama, T. (1990). Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology*, 101, 27-33.

- Itoh, J., Nabeshima, T., & Kameyama, T. (1991). Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *European Journal of Pharmacology*, *194*, 71-76.
- Jordan, K., Behlendorf, T., Mueller, F., & Schmoll, H-J. (2009). Anthracycline extravasation injuries: management with dexrazoxane. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *5*, 361-366.
- Jordán, J., Ikuta, I., García-García, J., Calleja, S., & Segura, T. (2007). Stroke pathophysiology: management challenges and new treatments advances. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *63*(3), 261-278.
- Juurlink, B. H. J., & Sweeney, M. I. (1997). Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, *21*(2), 121-128.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill.
- Khan, S-N., Baziany, A., Banigesh, A., Hemmings, S. J., & 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.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Silveira, R., Morato, S., & Walsh, T. J. (2000). Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus-maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, *117*, 97-105.
- Lennartz, R. C. (2008). The role of extramaze cues in spontaneous alternation in a plus-maze. *Learning & Behavior*, *36*(2), 138-144.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, *79*, 1431-1568.
- Lister, G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, *92*, 180-185.
- Macaya, A., Munell, F., Reventós, J. y Ferrer, I. (1996). Factores moleculares en la hipoxia-isquemia cerebral. *Revista de Neurología*, *24*(131), 855-864.
- Martin, J. H. (1989). *Neuroanatomy. Text and atlas* (pp. 81-101). New York, NY: Elsevier.
- Méndez, R. I. (1977). Modelos estadísticos lineales. Interpretación y aplicaciones. FOCCA/CONACyT, México.
- Méndez, R. I., Namihira, D. y Fortul, M. T. (1984). *El protocolo de investigación, su elaboración y análisis*. México: Trillas.

- Menzies, S. A., Hoff, J. T., & Betz, A. L. (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, *32*, 100-6, discussion 106-7.
- Modo, M., Stroemer, R. P., Tang, E., Veizivic, T., Sowniski, P., & Hodges. (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, *194*, 99-109.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *11*, 47-60.
- Ng, Y. S., Stein, J., Ning, M. M., & Black-Schaffer, R. M. (2007). Comparison of clinical characteristics and functional outcomes of ischemic stroke in different vascular territories. *Stroke*, *38*, 2309-2314.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; Secretaría de Salud, 1999.
- Olton, D. S. & Samuelson, R. J. (1976). Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology (Animal Behavior)*, *2*, 97-116.
- Olton, D. S. (1987). The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology and Behavior*, *40*, 793-797.
- Onténiente, B., Rasika, S., Benchoua, A., & Guégan, C. (2003). Molecular pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. *Molecular Neurobiology*, *27*(1), 22-72.
- Otto, T. & Eichenbaum, H. (1992). Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. *Behavioral Neuroscience*, *106*, 762-775.
- Patel, M. D., Coshall, C., Rudd, A. G., & Wolfe, C. D. A. (2003). Natural history of cognitive impairment after stroke and factors associated with its recovery. *Clinical Rehabilitation*, *17*, 158-166.
- Pébet, M. (2002). Epidemiología y factores de riesgo. En F. Micheli, M. A. Nogués, J. Asconapé, M. Fernández y J. Biller. *Tratado de neurología clínica* (pp. 390-395). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Pellow, S., Chopin, Ph., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*, 149-167.
- Pontecorvo, M. J. (1983). Effects of proactive interference on rats' continuous nonmatching-to-sample performance. *Animal Learning and Behavior*, *11*, 356-366.

- Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Garvi, J. M., Matías-Guiu, J., Roda, J. M., Garcia-Albacar, J. A. (2008). Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Revista de Neurología*, 47, 414-426.
- Programa de acción. Enfermedades cardiovasculares e hipertensión. (2001). Secretaría de Salud [SSA], México.
- Pulsinelli, W. A., Brierly, J. B., & Blum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology*, 11, 491-498.
- Read, S. J., Hirano, T., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (1999). Limiting neurological damage after stroke. A review of pharmacological treatment options. *Drugs and Aging*, 14(1), 11-39.
- Roberts, W. A. (1998). Principles of animal cognition. New York, NY: Mc Graw-Hill.
- Roda, J. M., Carceller, F., Pascual, J. M., Herguido, M. J., González-Llanos, F., Alonso de Leciñana, M., Díez-Tejedor, E. (2008). Modelos animales experimentales en isquemia cerebral. *Neurología*, 13(9), 427-430.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J. T., Cole, J. C., Dewar, C. V., Kidd, G. R., & Kimpson, P. H. (1996). Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51(1), 41-50.
- Rodríguez, R., Gerson, R., & Santiago-Mejía, J. (2000). Dexrazoxane-induced reduction in mortality in mice subjected to severe forebrain ischemia. *Drug Development Research*, 51, 149-152.
- Rodríguez, R., Rodríguez-Boscan, I., Lugo-Sira, D., Vidrio, H., Hong, E., Medina, M. & Herrera, I. (2000). Bilateral sequential common carotid artery sectioning in mice as a new model for testing neuroprotective drugs. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease*, 9(1), 45-53.
- Rodríguez, R., Santiago-Mejía, J., Fuentes-Vargas, M., & Ramírez, E. S. J. (2003). Outstanding neuroprotective 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., & Ramírez, E. S. J. (2005). A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 147(1), 22-28.
- Rogers, D. C., Campbell, C. A., Stretton, J. L., & Mackay, K. B. (1997). Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 28, 2060-2066.

- Rosenthal, R. & Rosnow, R. L. (1991). *Essentials of behavioral research: Methods and data analysis*. E.E. U.U.: McGraw-Hill Series in psychology.
- Rothblat, L. A. & Hayes, L. L. (1987). Short-term object recognition memory in the rat: nonmatching with trial-unique junk stimuli. *Behavioral Neuroscience*, *101*, 587-590.
- Santiago-Mejía, J., Fuentes-Vargas, M., Rios, C., Vidrio, H., & Rodriguez, R. (2004). Effect of ascorbic acid, dihydrolipoic acid, t-butylhydroquinone, and phenylbutylnitrone on mortality and neurological impairment induced by sequential common carotid artery sectioning in mice. *Drug Development Research*, *63*, 212-218.
- Scremin, O. U. (2004). Cerebral vascular system. En G. Paxinos & J. K. Mai (Eds.). *The human nervous system* (pp. 1325-1348). San Diego, USA: Elsevier.
- Sharma, A. C. & Kulkarni, S. K. (1992). Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *16*, 117-125.
- Silva, R. H. & Frussa-Filho, R. (2000). The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods*, *102*, 117-125.
- Sison, M. & Gerlai, R. (2010). Associative learning in zebra fish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioral Brain Research*, *207*, 99-104.
- Small, D. L. & Buchan, A. M. (2000). Animal models. *British Medical Bulletin*, *56*, 307-317.
- Takeda, Y., Jacewicz, M., Nowak, T. J., & Pulsinelli, W. A. (1993). DC-potential, and energy metabolites in the focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *13*, S450.
- Tatemichi, T. K., Desmond, D. W., Stern, Y., Paik, M., Sano, M., & Bagiella, E. (1994). Cognitive impairment after stroke: frequency, patterns, and relationship to functional abilities. *Journal of Neurology and Neurosurgery Psychiatry*, *57*, 202-207.
- Traystman, R. (2003). Animal models of global cerebral ischemia. *ILAR Journal*, *44*, 85-95.
- Vidrio, H., Carrasco, O. F., & Rodriguez, R. (2006). Antivasoconstrictor effect of the neuroprotective agent dexrazoxane in rat aorta. *Life Sciences*, *80*, 98-104.
- Villanueva, J. A. (2004). Enfermedad vascular cerebral: factores de riesgo y prevención secundaria. *Anales de Medicina Interna*, *21*, 159-160
- Wahlgren, N. G. & Ahmed, N. (2004). Neuroprotection in cerebral ischemia: facts and fancies the need for new approaches. *Cerebrovascular Diseases*, *17*(1), 153-168.

Weiss, G., Loyevsky, M., & Gordeuk, V. R. (1999). Dexrazoxane (ICRF- 187). *General Pharmacology*, 32(1), 155-158.

Wright, A. A. (2007). An experimental analysis of memory processing. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 88(3), 405-433.

VII. ANEXO

7.1 Definiciones

Apraxia. Dificultad para realizar movimientos voluntarios.

Amaurosis fugaz. Infarto localizado en la retina que produce ceguera por un corto intervalo de tiempo

Diplopía. Visión doble

Disartria. Trastorno del habla causado por la ausencia de control sobre los músculos de la cara y de la boca

Disfagia. Problemas en la deglución de alimentos

Hemianopsia homónima. Ceguera de la mitad del campo visual de uno o ambos ojos.

Negligencia unilateral. Ausencia de reacción a la mayoría de los estímulos situados en el campo visual contralateral con relación a la lesión.

Síncope. Pérdida brusca de conciencia y de tono postural, de duración breve.