



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



EFFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA
ASOCIATIVA POR CONDICIONAMIENTO AVERSIVO.

TESIS QUE PARA OBTENER TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

NURIA SOFÍA FUENTES SAAVEDRA

DIRECTORA: DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO

REVISOR: DR. ÓSCAR ZAMORA ARÉVALO

COMITÉ: DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO

LIC. KATIA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

LIC. ALEJANDRA DE LA CONCEPCIÓN AGUAYO DEL CASTILLO

MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la UNAM porque además de brindarme formación, me permitió construir momentos increíbles, "Por mi raza hablará el espíritu".

A la Fundación de Exalumnos UNAM, por el apoyo para poder culminar este proyecto.

A mi comité: a todos, muchas gracias por sus aportaciones para que este trabajo se construyera de mejor manera.

Dra. Claudia Gómez, por confiar en mí aún sin conocerme y darme la libertad de plantear mi propia idea, probablemente de no ser así hubiera tenido que recurrir no sólo al plan B sino al C y al D, gracias por ayudarme a superar las dificultades que se me presentaron a lo largo de este proyecto.

Dr. Oscar Zamora por recordarme que no todo está perdido cuando algo no sale como se esperaba, porque siempre hay opciones y que deben tomarse con el pensamiento más racional posible.

Dr. César Casasola por los chistes malos en las clases pero que me servían de mucho a la hora de estudiar, además, por haberme dado alternativas y asesoría.

Lic. Katia por los comentarios, correcciones y las facilidades para localizarla para hablar sobre este trabajo.

Lic. Alejandra por el tiempo dedicado a mi trabajo, por la minuciosa revisión de redacción y estilo, porque siempre aprendo mucho cuando voy contigo y por enseñarme hasta que aprenda y me quede claro.

Gracias

“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”

Julio Cortázar.

Más que otra cosa gracias por existir en mi vida.

A mi mamá por nunca dejarme decir no puedo, por apoyarme siempre y en todo, incluso a recortar, no importando que estuviera en la primaria o en los últimos semestres de la facultad, por ser mi mamá y por esforzarte, por hacerlo diferente, por consentirme, por esas pláticas con cafecito y por dejarme hacerlo “yo solita” (aunque a veces no parezca tan buena idea).

Mau por las noches de luces encendidas, nuestros chistes, por los juegos, hasta por el no saber qué hacer y aun así abrazarme, por ser hilarante y tener tu humor “tan tuyo”, por las peleas y porque a pesar de todo y aunque se corte la conversación, siempre has estado conmigo, haces más de lo que piensas, a pesar de las diferencias y que yo sea muy niña me apoyas como nadie, por ser mi confidente y estar conmigo, te adoro como solo a ti en la vida (¿niño?, oh no mis ovejas que alguien me ayude).

A mi abue, mi abuelo y mi tía Mary por la dicha y el regalo de tenerlos en mi vida, por dejarme crecer con ustedes con los cuentos, los juguetes y la comida rica, por todos los recuerdos, los ejemplos, el cariño, los domingos, los festivales y las novelas, porque sin ustedes jamás hubiera llegado a aquí, por estar para mí y por estar conmigo eternamente.

A mi papá por enseñarme a ser independiente, por confiar en mí y en mis decisiones, también por esas noches de mucho tráfico, lluvia o partidos, por apoyarme y dejarme saber que cuento contigo.

A mi tía Claudia, Julieta y a mi tía Sonia, por todo el apoyo y las porras.

A Luigi por las historias bizarras, las crepas, lasaña, la ropa, escuchar aunque no entiendas, aunque no sepas qué hacer, por compartir lo que haces y reír y reír juntos, por bailar como conejo e ir a la iglesia para lacios, por las películas en el espacio y las de navidad, por tirar el dinero a la basura y la salsa al piso, pero más que todo, por formar juntos nuestra gran familia feliz.

A Diego por haber llegado a mi vida y llenarla de historias y de Historia, de risas, de retos, secretos y confesiones, por los viajes kilométricos, por confiar en mí y no permitir que dejara de confiar en mí misma, ante la tesis, el experimento, la vida o hasta los retos históricos de Chapultepec, por los museos, los tamales verdes en torta y los pastelitos, por las fotos, por los juegos, por detener el tiempo. Por todas aquellas cosas que son sólo nuestras... no me alcanzarían las palabras... el tiempo... la vida...

A Mike por recorrer el camino a mi lado, por las tardes de crepas y granizo, por enfrentar al monstruo, por fascinarme con los casos clínicos y esas prolongadas discusiones sobre

mitocondrias, por apoyarme siempre... no podría decir todo lo que significa, así que gracias, por todo, por siempre.

A Migue por los domingos de tatuajes y la pura buena onda en la tiendita, por bailar conmigo, a Manuel por ser todo un bombón, a Mary por las choleces y por esos días consumistas al mayoreo, a Ari por las pláticas en talleres. A todos mis compañeros que se convirtieron en mis amigos, gracias por llenar mi vida con su luz.

A Luis por las clases y los “¿ah, sí? Pues vete...”, a Lis por las tardes maratónicas entre ratones sin luz y cirugía extrema, a David por el éter aunque fuera sin guayaba, a Mayra por ser maestra, a Marco por las consultas gratis y por entender mi estrés.

A Paulo por diseñarme una caja para ratones, por reír y cantar conmigo. A Mara por decirnos las verdades de la vida y más que nada, a pesar del tiempo y los tiempos seguir aquí. A Miguel por el cine, las palomitas, las comidas y hasta los berrinches, por todas las historias que hemos construido. A Chucho por aquello que nadie entiende.

A Ale pingüino, por siempre tener la puerta abierta hacia mis dudas metodológicas y existenciales, por recordarme el bello camino que se descubre con la ciencia y seguir orientándome desde segundo semestre hasta el final, por recordarme por qué hago lo que hago y ayudarme a pensar con claridad, por tener siempre esa emoción ante datos no publicados y por hacerme una mejor científica.

Por último, lo más importante, porque sin ellos jamás hubiera podido llevar a cabo este proyecto, gracias a mis hermosos bebés gordos, siempre los llevaré en el corazón y en el recuerdo, porque existieron para mí, en algún momento.

“If you don’t know where you want to go,
then it doesn’t matter which path you take”

Lewis Carroll.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
• Anatomía vascular cerebral	5
• Evento vascular cerebral (EVC)	8
• Isquemia cerebral aguda	10
• Patofisiología	13
• Modelos animales para el estudio de la isquemia cerebral aguda	22
• Aprendizaje y memoria	28
JUSTIFICACIÓN	43
PEGUNTA DE INVESTIGACIÓN	45
OBJETIVO	46
• Objetivo general	46
• Objetivos específicos	46
HIPÓTESIS	46
MÉTODO	48
• Sujetos	48
• Procedimiento	48
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIÓN	68
REFERENCIAS	70
ANEXO	83

LISTA DE ABREVIATURAS

2 VO	Modelo de oclusión de 2 vasos sanguíneos
4 VO	Modelo de oclusión de 4 vasos sanguíneos
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca⁺⁺	Ion de Calcio
CAO	Condicionamiento aversivo al olor
CAPO	Condicionamiento aversivo potenciado al olor
CAS	Condicionamiento aversivo al sabor
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
EN	Estímulo neutro
EVC	Evento vascular cerebral
K⁺	Ion de Potasio
LiCl	Cloruro de Litio
Mg⁺	Ion de Magnesio
Na⁺	Ion de Sodio
RC	Respuesta condicionada
SSACC	Modelo de oclusión secuencial bilateral de arterias carótidas comunes

Resumen

Para el óptimo funcionamiento de cualquier órgano se requiere que el aporte sanguíneo sea el adecuado de lo contrario, se producen severas consecuencias anatómicas y funcionales. Tal es el caso de la isquemia cerebral, la cual, se presenta como consecuencia de la disminución sanguínea que recibe el cerebro, dicha alteración, induce una serie de reacciones metabólicas que culminan con muerte celular. Dependiendo de la severidad y localización del daño, puede inducirse un estado de coma o incluso la muerte. Las secuelas que presentan los pacientes con dicha patología pueden llegar a ser altamente incapacitantes, principalmente las alteraciones que presentan los pacientes son de carácter motor, sensorial y cognitivo, en especial los relacionados con problemas de memoria.

En el año 2000, se implementó un modelo de isquemia cerebral aguda en ratones que consiste en la sección bilateral secuencial de arterias carótidas comunes (SSACC). Una de las ventajas más significativas que presenta este modelo, es que permite establecer un estado basal de hipoperfusión sanguínea cerebral antes de inducir el evento isquémico. Este paradigma presenta una mayor analogía con lo que sucede en los humanos, dado que se ha demostrado que comúnmente el sistema ingresa de manera gradual a un estado patológico que culmina con el evento agudo. Sin embargo, los déficits cognitivos asociados a dicho modelo no han sido caracterizados en su totalidad, por lo que el presente trabajo se enfocó en el estudio de las alteraciones en el aprendizaje y memoria asociativos de los sujetos sometidos al modelo de SSACC.

El paradigma de condicionamiento aversivo potenciado al olor (CAPO) parte del supuesto del condicionamiento clásico, por lo que permite apreciar los procesos de establecimiento y evocación de información ambiental que se relacionan con experiencias desagradables, aspecto fundamental que le proporciona gran validez ecológica a la tarea.

Para la presente investigación se utilizaron ratones macho, de 8 meses de edad al inicio del experimento. Se dividieron en 3 grupos: control, sham e isquemia, fueron entrenados en el paradigma de CAPO y se realizaron evaluaciones de consumo pre y post isquemia.

Los resultados obtenidos señalan que ninguno de los 3 grupos mostró déficits en la capacidad de discriminación de los estímulos gustativos y olfativos intrínsecos de la tarea, tampoco se encontraron diferencias en el proceso de adquisición de CAPO. Sin embargo, el grupo isquemia, mostró gran dificultad para ejecutar la prueba después de que los sujetos fueran sometidos al modelo SSACC, indicando que al menos este modelo de isquemia cerebral causa afectaciones en el desempeño.

Palabras clave: Aprendizaje, Memoria, Condicionamiento aversivo, Sabor, Olor, Isquemia cerebral.

Introducción

La sangre, además de proveer oxígeno y glucosa, distribuye hormonas y otras sustancias que regulan la función celular y permite el regreso del dióxido de carbono (CO₂) a los pulmones, así como de otros productos metabólicos a los riñones. En condiciones normales, el volumen total de sangre circulante en el cuerpo es aproximadamente el 8% del peso corporal, por ejemplo, el volumen sanguíneo para un varón que pesa 70kg sería de 5600ml (Barret, Barman, Boitano, Brooks, 2011). Alrededor del 18% del volumen sanguíneo total circula al interior del cerebro, a pesar de que éste sólo representa alrededor del 2% del peso corporal, mientras que del gasto cardiaco, el encéfalo ocupa alrededor del 13.9% y 18.4% del consumo total de oxígeno, siendo el flujo sanguíneo por minuto de 750ml aproximadamente (Barret y cols., 2011).

Cuando se presentan anomalías que provocan alteraciones en la perfusión cerebral, se origina un síndrome clínico neurológico denominado: evento vascular cerebral (EVC) (Arauz y Ruíz-Franco, 2012); comúnmente un EVC es de tipo isquémico, es decir que se presenta muerte celular debido a una serie de reacciones bioquímicas desencadenadas ante la demanda metabólica insatisfecha por la falta de aporte sanguíneo (Ishimaru, Ikarashi, Takahashi, Maruyama, 1993; Cipolla, 2009). Los EVC producen una alta tasa de déficits neuropsicológicos como: afasia, negligencia, apraxia, déficit en orientación espacial y en memoria, síntomas sensoriales y motores (Block, 1999; Movassaghi, Sharifi, Soleimani, Joghataii, Hashemi, Shafaroodi, Mehdizadeh, 2012), provocando deterioro permanente y progresivo, causando secuelas altamente incapacitantes que comprometen significativamente la calidad de vida de los pacientes que padecen este síndrome.

De acuerdo con la OMS, en el año 2012 se registraron 17.5 millones de muertes asociadas a eventos cerebrovasculares, afectando por igual a hombres y mujeres (OMS, 2015). Por tal motivo, es primordial que se diseñen nuevas estrategias de prevención, tratamiento y rehabilitación para no sólo disminuir la prevalencia de la

patología, sino proveer a los pacientes de mejores estrategias que les permitan reintegrarse a su entorno familiar y laboral.

Comúnmente, las estrategias de rehabilitación se han enfocado en el tratamiento de las secuelas motoras que genera un EVC, no obstante, es necesario abordar las secuelas cognitivas que puede presentar el paciente, dado que dicha información es primordial para el desarrollo de nuevos planes de intervención.

Ante tal situación, se ha intensificado la búsqueda de nuevos modelos animales de isquemia cerebral, que permitan evaluar las alteraciones cognitivas subsecuentes al daño celular. En el modelo de oclusión secuencial bilateral de arterias carótidas comunes (SSACC), la inducción del evento isquémico es de manera global y permanente, ofreciendo la ventaja de evaluar alteraciones cognitivas y conductuales que se presentan a partir de la muerte celular durante un evento agudo de una manera similar a la que sucede con los seres humanos (Rodríguez, Rodríguez-Boscan, Lugo-Siria, Vidrio, Hong, Medina, Herrera, 2000a).

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de la isquemia cerebral aguda sobre el aprendizaje y la memoria asociativa, se conoce poco acerca del efecto de la isquemia en procesos mnésicos utilizando el paradigma conductual de condicionamiento aversivo potenciado al olor (Miranda, Ferry, Ferreira, 2007). Ofrece la ventaja de ser experimentalmente sencillo y permite valorar al sujeto mediante el uso de una tarea confiable dadas las características intrínsecas que le otorgan validez.

Antecedentes

Anatomía vascular cerebral

El flujo sanguíneo debe aportar oxígeno, glucosa y otros nutrientes al tejido nervioso, además de eliminar el dióxido de carbono, ácido láctico y otros subproductos metabólicos; para cubrir dichas funciones, el encéfalo se encuentra irrigado por dos principales sistemas vasculares: el sistema carotídeo y el sistema vertebrobasilar (Alejo-Martínez, 2011).

Sistema carotídeo

Lo componen las arterias carótidas internas que surgen de las arterias carótidas comunes, ingresando a la base del cráneo a nivel de la 4ª vértebra cervical a través del conducto carotídeo del hueso temporal. Se divide en varias ramas que dan origen a la arteria oftálmica, arteria coroidea anterior, arteria comunicante posterior, arteria cerebral anterior y arteria cerebral media. De manera general, el sistema carotídeo se encarga de irrigar la porción anterior del cerebro, principalmente a los núcleos amigdalinos, hipocampo, cíngulo y giro dentado (Waxman, 2011).

Sistema vertebrobasilar

Su función es irrigar la porción posterior del encéfalo como al tálamo, fórnix y tectum. Las arterias vertebrales se originan de las arterias subclavias; viajan procedentes desde la 6ª vértebra cervical; finalmente, ingresan al cráneo por el agujero occipital, donde continúan subiendo sobre el bulbo raquídeo y se unen al vaso del lado opuesto formando así, la arteria basilar. Las principales arterias que pertenecen a éste sistema son: espinal anterior y posterior, paramediana pontina, cerebelosa superior, cerebelosa posteroinferior, cerebelosa anteroinferior, calcarina, parietooccipital interna y la cerebral posterior (Snell, 2010).

Polígono de Willis

Se denomina polígono o círculo de Willis al área de confluencia de vasos cerebrales en la base del encéfalo, permite la unión del sistema carotídeo y el vertebrobasilar (Fig. 1). El polígono se conforma por las arterias carótida interna, cerebral anterior, comunicante anterior, cerebral posterior y comunicante posterior (Waxman, 2011).

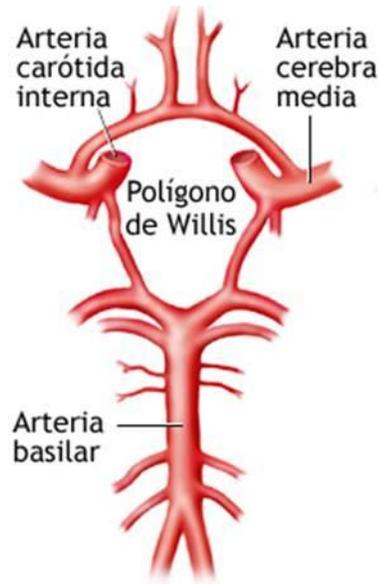


Fig. 1. Polígono de Willis. Muestra las arterias: carótida interna, cerebral media y basilar. Modificado de Hernández-Aguilar, 2013.

Arterias cerebrales

Las arterias más importantes, encargadas del aporte sanguíneo al cerebro son: arterias cerebrales anteriores, arterias cerebrales mediales y arterias cerebrales posteriores. Como se mencionó, las arterias cerebrales anteriores provienen del sistema carotídeo y forman parte del polígono de Willis, al igual que las arterias cerebrales posteriores, que surgen del sistema vertebrobasilar; las arterias cerebrales medias a pesar de que no conforma al polígono de Willis, son sumamente importantes dada la región que irrigan, principalmente la superficie lateral del hemisferio cerebral (Fig. 2) (Snell, 2010).

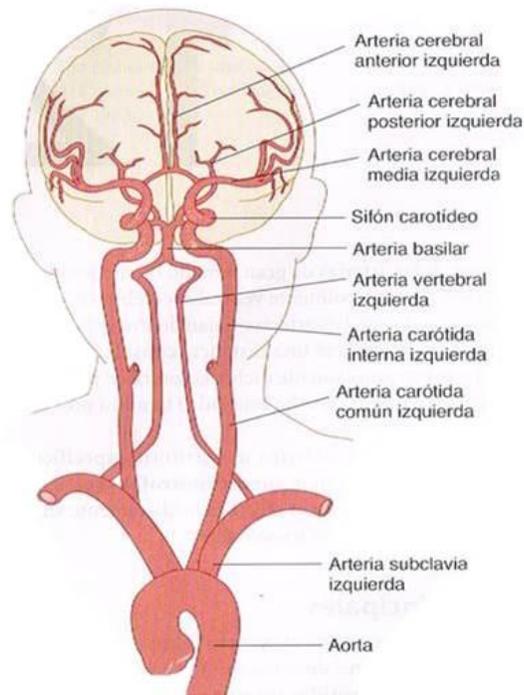


Fig. 2. Principales arterias cerebrales. Tomado de Waxman, 2011.

Cuando el corazón o algún vaso sanguíneo presentan anomalías que alteran la irrigación sanguínea, se da lugar a una serie de condiciones patológicas llamadas enfermedades cardiovasculares. Dentro de dicha clasificación, se encuentran los eventos vasculares cerebrales (Arauz y Ruíz-Franco, 2012).

Evento vascular cerebral (EVC)

Un EVC es una alteración neurológica que produce una reducción significativa en el aporte sanguíneo hacia el cerebro, se caracteriza por su aparición brusca sin otra razón aparente que la vascular. Dependiendo de la región afectada serán los síntomas que el paciente presente. De manera general la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone que algunos de los síntomas son: pérdida súbita de fuerza muscular y/o entumecimiento generalmente unilateral en los brazos, piernas o cara; confusión, dificultad para hablar o comprender el lenguaje, visión borrosa o reducción de la visión en uno o ambos ojos, dificultad para caminar, mareos, pérdida de equilibrio y/o coordinación, dolor de cabeza intenso y debilidad o pérdida de conciencia, todos ellos con duración de 24 horas o más (OMS, 2015).

Las condiciones patológicas que provocan interrupción parcial o pérdida total de irrigación sanguínea hacia el cerebro, de acuerdo a su causa pueden ser divididas en dos grandes clasificaciones: hemorrágico e isquémico (Fig. 3). En el caso particular del EVC de tipo isquémico, el origen puede deberse a un émbolo o a un trombo (Arauz y Ruíz-Franco, 2012).

- Hemorragia: Ruptura de un vaso sanguíneo, la mayoría son causadas por rupturas de aneurismas, es decir pequeños abultamientos en las paredes de un vaso sanguíneo. Frecuentemente se presentan en el espacio subaracnoideo en pacientes con antecedentes de hipertensión arterial (Arauz y Ruíz-Franco, 2012).
- Embolia: Un émbolo es un coágulo que viaja por el torrente sanguíneo hasta llegar a un vaso cuya luz es tan estrecha que impide que continúe viajando, generando una interrupción de la irrigación (Arauz y Ruíz-Franco, 2012).
- Trombosis: Se presenta por la disminución en el diámetro de un vaso sanguíneo debido a la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos, dicho trastorno que se conocen con el nombre de aterosclerosis.

Cuando un fragmento de tales depósitos de grasa se desprende del interior del vaso, viaja a través del torrente sanguíneo y obstruye el paso de sangre. Alrededor del 50% de casos totales de EVC se deben a tal situación (Arauz y Ruíz-Franco, 2012).

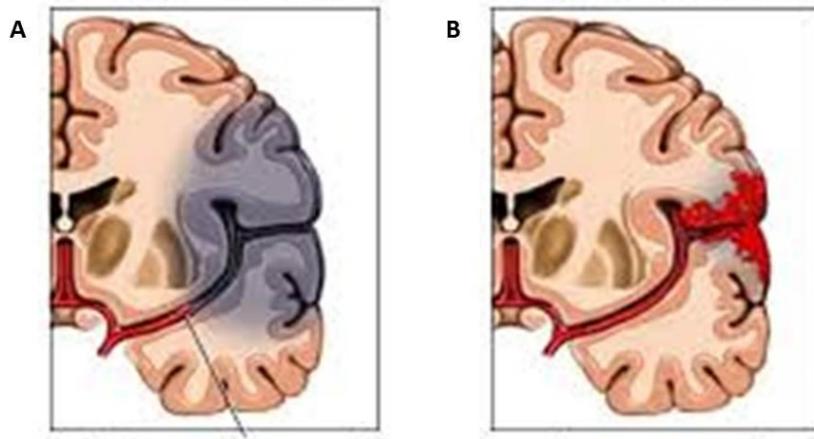


Fig. 3. Tipos de EVC. Se muestra la clasificación general de acuerdo a su causa de origen. **A.** EVC de tipo isquémico que puede ser producido por embolia o trombosis. **B.** EVC de tipo hemorrágico. Tomado de Alejo-Martínez, 2011.

Existe un tipo de EVC denominado ataque isquémico transitorio (TIA por sus siglas en inglés) que se caracteriza por su breve duración, siendo no mayor a las 24h, frecuentemente presenta recuperación espontánea, por lo cual no provoca alteraciones clínicas subsecuentes, sin embargo es un factor predisponente para el desarrollo de futuros infartos (American Stroke Association, 2014).

De las causas más comunes que causan un EVC, alrededor del 20% provienen de un émbolo del corazón y el 25% son denominados infartos lacunares causados por la oclusión de una pequeña ramificación de alguna arteria cerebral, se ha observado que de manera general la arteria cerebral media presenta mayor índice de incidencia de un EVC (Warlow, Sudlow, Dennis, Wardlaw, Sandercock, 2003; Haast, Gustafson, Kiliaan, 2012). De igual forma, es común que la arteria

vertebrobasilar se ocluya y provoque isquemia en la circulación cerebral posterior (Merwick, Werring, 2014).

Se han identificado factores de riesgo para la aparición de un EVC, como son: los malos hábitos de alimentación, inactividad física, el consumo excesivo de sal, tabaco o alcohol, niveles elevados de colesterol y la presencia de otras enfermedades degenerativas como: diabetes *mellitus* e hipertensión arterial (Macrae, 2011). Otro de los principales factores de riesgo para la incidencia y prevalencia del EVC es la edad del paciente, afectando principalmente a personas mayores de 65 años, debido a la reducción significativa en el diámetro de los vasos sanguíneos cerebrales (Bell y Ball, 1981; Martins, Pereira, Díaz, Ferreira, Weffort de Oliveira, Milani, 2012) y al incremento de la permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BHE) (Sohrabji, Bake, Lewis, 2013). La BHE se encarga de mantener la homeostasis cerebral bloqueando selectivamente, la entrada de la mayoría de las sustancias que viajan por la sangre (Hua, Qing, Li, Li, Hou, Hu, Hong, Sun, Zhu, 2010).

Isquemia cerebral aguda

Definición y clasificación

La isquemia cerebral es una condición patológica que resulta de la reducción del aporte sanguíneo hacia el cerebro $<10\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$ (Waxman, 2011); fenómeno que provoca la falta de oxígeno y glucosa, generando que las células presenten cambios bioquímicos y moleculares que inducen muerte celular, fenómeno que comúnmente es denominado infarto. La región donde se localiza el infarto se llama núcleo isquémico o *core*, mientras que la región que lo circunda se denomina zona de penumbra (Fig. 4), la cual supera al área central; en ésta, la disminución del flujo sanguíneo no es tan drástica como lo es en el *core*, debido al aporte de arterias colaterales, que inducen mecanismos vasculares compensatorios.

La zona de penumbra, es una región de tejido encefálico en riesgo de afectarse irreversiblemente, pero es potencialmente viable. Se divide en dos áreas, la más

próxima al núcleo se encuentra en peligro de necrosarse por extensión de la zona central y la porción distal que puede presentar daño funcional pero también puede contribuir a la recuperación funcional y evolucionar hacia la normalidad. En estas regiones no hay límites bien definidos sino que existe un tránsito gradual de una a otra (Sánchez-Chávez, 1999). Las células en la zona penumbra son afectadas por el flujo de células inmunes como mediadores inflamatorios tóxicos, que limitan la región dañada, protegen al tejido y a las células adyacentes e inician mecanismos que regulan la homeostasis (Trendelenburg, 2014).

Comúnmente, la región de penumbra es el blanco de muchos tratamientos farmacológicos que pretenden impedir el progreso de muerte celular, sin embargo, la viabilidad del tejido es breve y debe procederse a la intervención de manera oportuna. El tiempo delimita las fronteras de la llamada “ventana terapéutica”, es decir el periodo durante el cual, el tejido aun es viable para iniciar el tratamiento (Baron, 2001; Donnan, Fisher, Macleod, Davis, 2008; Tobin, Bonds, Miinshall, Pelligrino, Testai, Lazarov, 2014).

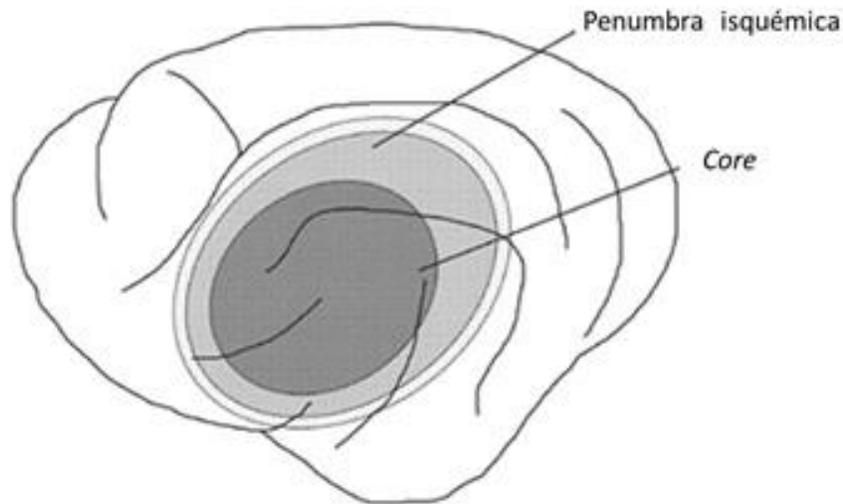


Fig. 4. Núcleo y penumbra isquémicos. Representación esquemática de un encéfalo, en gris oscuro se muestra el núcleo isquémico y en gris claro la región de penumbra. Tomado y modificado de Hernández-Aguilar, 2013.

La región afectada puede presentarse en todo el encéfalo denominándose isquemia global que comúnmente se debe a infartos cardiacos, pero si la lesión se

sitúa en un territorio definido se nombra isquemia focal (Iadecola y cols., 1999). Se ha reportado que tanto el volumen de la lesión, la fuerza del estímulo, la duración de la oclusión, como la profundidad del daño (Cramer y Toorop, 1998), son indicadores importantes para predecir las consecuencias conductuales y cognitivas, que puedan presentar los pacientes a corto y largo plazo (Rodrigo, Fernández, Serrano, Peinado, Martínez, 2005; Trendelenburg, 2014).

Patofisiología

La isquemia produce una serie de reacciones metabólicas a nivel molecular denominadas en su conjunto “cascada isquémica” (Fig. 5). Tales reacciones son consecuentes a la privación de aporte sanguíneo y se presentan con diferente temporalidad (Fig. 6).

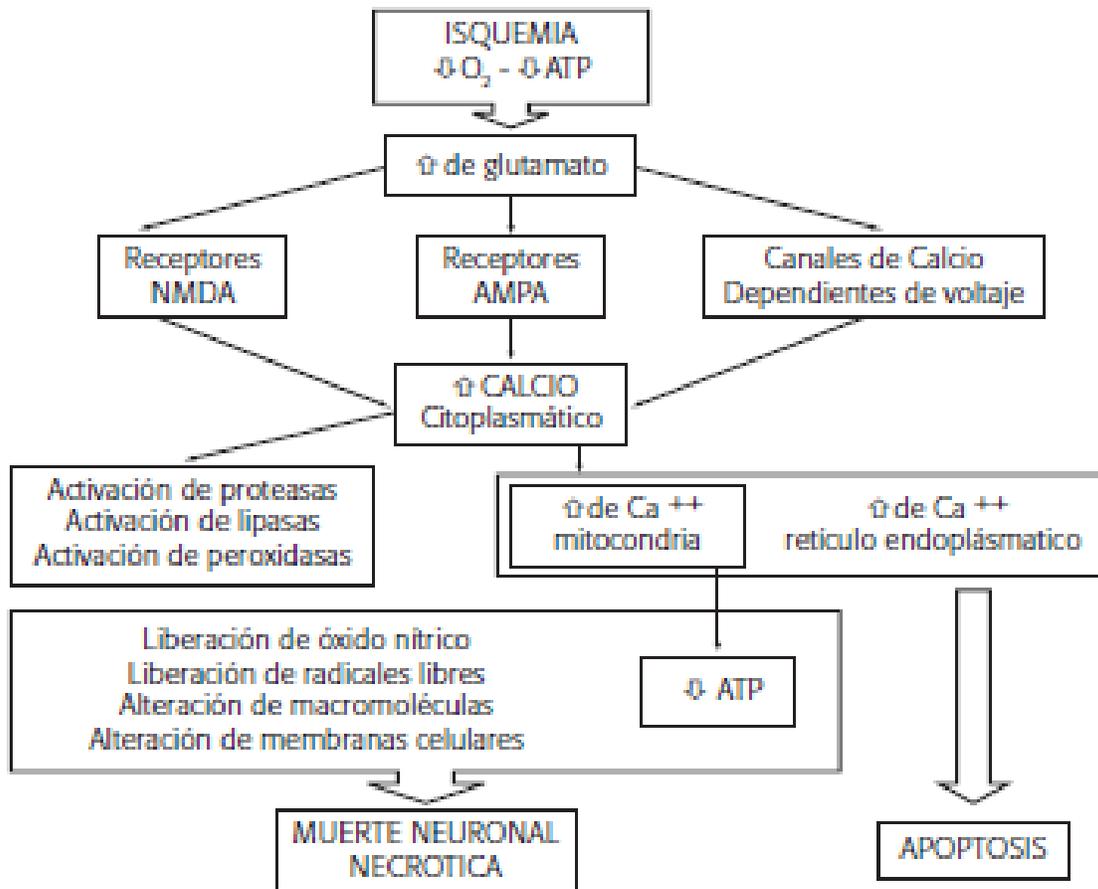


Fig. 5. Cascada isquémica. Después de la reducción de los niveles de oxígeno y ATP, los receptores glutamatérgicos NMDA inducen un proceso de excitotoxicidad, el cambio de voltaje en la membrana celular permite la apertura de los canales de Ca⁺⁺ dependientes de voltaje, provocando aumento en el Ca⁺⁺ intracelular, lo cual, puede favorecer la muerte apopótica o necrótica de las células cerebrales. Tomado de Cassiani-Miranda y Borrero-Varona, 2013.

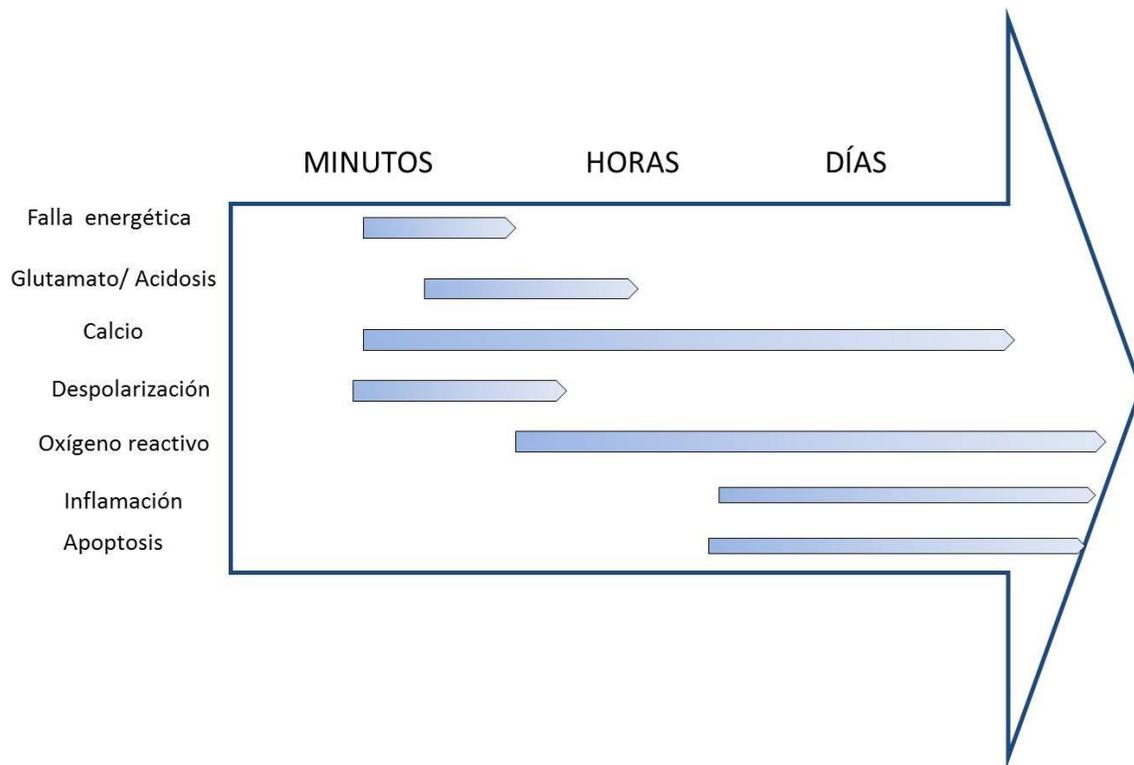


Fig. 6. Secuencia temporal de la cascada isquémica. Después de la falta de oxígeno con forme pasa el tiempo, se inician una serie de reacciones bioquímicas, que comienzan por la falla energética y una subsecuente acidosis, despolarización e incremento en el Ca^{++} intracelular durante los primeros minutos, este fenómeno se prolonga por horas. Posteriormente, aparecen otros eventos como el estrés oxidativo producido por el oxígeno reactivo y en cuestión de días aparece la inflamación y la muerte celular (apoptosis). Tomado de Cassiani-Miranda y Borrero-Verona, 2013.

Las células que no pueden obtener el aporte necesario de oxígeno y glucosa, entran en un tipo de respiración celular anaerobia que induce una serie de reacciones metabólicas, las cuales son descritas brevemente a continuación.

Acidosis láctica

Dentro de la cadena de reacciones químicas necesarias para que las mitocondrias logren ejecutar la respiración celular, es necesario el oxígeno proveniente de la sangre para que la glucosa pueda ser transformada en energía (ATP); cuando no existe oxígeno disponible, las células adoptan un sistema de respiración anaerobio que induce la formación de ácido láctico, la acumulación de dicho metabolito provoca decremento en el pH intra y extra celular. La cantidad de ácido láctico que

se genere depende del tiempo durante el cual se encuentre comprometido el flujo sanguíneo y de los depósitos tisulares de glucosa y glucógeno al momento de la isquemia (Becker, 2004), lo cual repercute en que el organismo presente un estado de acidosis (Heo, Han, Lee, 2005; Weis, Pettenuzzo, Krolow, Valentim, Mota, Dalmaz, Wyse, Netto, 2012).

Crisis energética y excitotoxicidad

Como consecuencia de la privación de ATP y de la inactivación de las ATP-etas, el gradiente iónico de la membrana celular se encuentra comprometido, lo que genera alteraciones en la bomba sodio (Na^+) / potasio (K^+), favoreciendo a la salida del K^+ al espacio intersticial, ocasionando despolarización anóxica (Onténiente, Rasika, Benchoua, Guégan, 2003) abriendo canales de calcio (Ca^{++}) dependientes de voltaje y que desencadena liberación masiva de glutamato (Haast, Gustafson, Kiliaan, 2012), causando activación de receptores postsinápticos AMPA y NMDA, lo cual permite aún más afluencia de Ca^{++} a través de los receptores, hasta que se alcanza un umbral de toxicidad, causando daño neuronal por el nivel de excitación tan elevado que activa proteasas, caspasas, lipasas y endonucleasas que inducen apoptosis (Murata, Omata, Fujibayashi, Waki, Sadato, Yoshimoto, Wada, Yonekura, 2000; Gui, Duan, Tian, Li, Zhu, Chen, Zheng, 2009; Ketheeswaranathan, Turner, Spary, Batten, McColl, Saha, 2011).

Producción de radicales libres

Un radical libre o especie reactiva de oxígeno (ROS) es un átomo o molécula capaz de existir independientemente como un átomo al contener uno o más electrones no apareados en su órbita más externa (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los radicales libres se forman como residuos metabólicos durante diversas reacciones celulares; en condiciones normales existen enzimas y mecanismos que impiden la acumulación de ROS, pero debido a la presencia de daño mitocondrial subsecuente a la isquemia (Blomgren y Hagberg, 2006) el sistema de recaptura y

degradación se encuentra comprometido, facilitando el incremento de niveles tóxicos de ROS, los cuales generan reacciones químicas que comprometen la funcionalidad de otros organelos celulares, causando fallas dentro de todo el sistema funcional celular en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Li, Liu, He, Floyd, Siesj, 1999; Hayashi, Saito, Okuno, Ferrand-Drake, Dodd, Chan, 2004; Osada, Kosuge, Ishige, Ito, 2010).

Los componentes celulares y moleculares de la circulación periférica se regulan por la BHE, después del daño, las uniones de las células del endotelio se vuelven permeables; ante la detección del infarto, el sistema inmune se activa gracias a los receptores tipo Toll, asociados a la membrana (TLRs) y células inmunes pueden infiltrarse en el parénquima cerebral, además que permiten que se secreten citosinas proinflamatorias como: interleucinas (IL)-1b, IL-6, IL-8 y factor-alfa de necrosis tumoral (TNF α) (Tobin y cols., 2014).

Inflamación

La respuesta inmune cerebral, que incluye elevaciones en las citosinas proinflamatorias, propicia cascadas de señalización que inducen edema cerebral (Vexler, Tang, Yenari, 2006; Felger, Abe, Kaunzer, Gottfried-Blackmore, Gal-Toth, McEwen, Iadecola, Bulloch, 2010). El edema cerebral se define como acumulación anormal de fluido al interior del parénquima cerebral produciendo ensanchamiento volumétrico de las células o tejido, puede clasificarse en dos tipos: edema citotóxico que se refiere a la hinchazón de los componentes celulares del cerebro debido a disturbios metabólicos; mientras que el edema vasogénico es causado por una ruptura en la barrera hematoencefálica (Heo, Han, Lee, 2005; Gui y cols., 2009). Como se mencionó, la barrera hematoencefálica es altamente efectiva para evitar el paso de la mayoría de los componentes no lipídicos de la sangre hacia el encéfalo, brindando protección y soporte metabólico (Harris, Gauden, Fraser, Williams, Parker, 2002), no obstante, durante condiciones patológicas como la isquemia cerebral, incrementa la permeabilidad a macromoléculas y permite el movimiento del fluido intravascular a espacios extravasculares generando

alteraciones homeostáticas (Klohs, Steinbrink, Bourayou, Mueller, Cordell, Licha, Schirner, Dirnagl, Lindauer, Wunder, 2009).

Apoptosis y necrosis

El término apoptosis hace referencia a muerte celular programada que incluye: cambios morfológicos como contracción de la célula, condensación de la cromatina y la formación de protuberancias citoplásmicas en la superficie celular. Usualmente se presenta en células dispersas en vez de encontrarse en grandes volúmenes de tejido. Las células que mueren por apoptosis son rápidamente removidas por fagocitos sin que se produzca reacción inflamatoria alguna. En contraste, la necrosis, que también es muerte celular, afecta a un gran número de células contiguas, provocando inflamación del citoplasma, mitocondrias y otros organelos celulares, generando ruptura en la membrana celular. Se ha descrito que las células con mayor tasa de muerte por necrosis son las que se localizan más cercanas al núcleo isquémico, mientras que las neuronas que presentan muerte apoptótica se localizan en la zona de penumbra, cuyo inadecuado soporte de oxígeno limita su capacidad para producir ATP y si no hay restauración del flujo sanguíneo, gradualmente se incorpora al foco isquémico y queda dañado, irreversiblemente (Love, 2003; Trendelenburg, 2014).

La isquemia cerebral no sólo daña a las células del sistema nervioso y causa disfunción de la BHE (Klohs y cols., 2009), sino que provoca alteraciones en los astrocitos. Los astrocitos, se encargan de regular el ambiente osmótico, ante altos niveles de toxicidad por glutamato, se producen alteraciones en los mecanismos de transporte y en vías de señalización de la recepción de dicho aminoácido, pudiendo causar inflamación de los astrocitos, liberación de glutamato y despolarización anóxica; lo cual es sumamente dañino (Chen, Liao, Kuo, 2000). Además, durante la isquemia, se altera el sistema amortiguador de K^+ e H^+ . Los ROS, generados consecuentemente de la hipoxia, causan despolarización de la membrana mitocondrial del astrocito, lo que altera la permeabilidad de la membrana, lo cual puede generar muerte celular debido a la activación de

polimerasas (Chen y Swanson, 2003). Aunque generalmente, los astrocitos son más resistentes a la isquemia que las neuronas, debido a que los astrocitos son capaces de sobrevivir y funcionar en situaciones hipóxicas, la acumulación de ácido láctico causa deterioros en el metabolismo y propicia daño irreversible en dichas células (Chen y Swanson, 2003), pues la condición patológica a la que se somete el organismo provoca un ambiente celular tóxico, comprometiendo la integridad y funcionalidad del sistema (Sohrabji, Bake, Lewis, 2013).

Alteraciones clínicas de la isquemia cerebral

Las características de las manifestaciones clínicas consecuentes a un EVC, serán específicas para cada individuo y se presentarán en función del tiempo y severidad de hipoperfusión; generando secuelas motoras, cognitivas y conductuales incapacitantes para el paciente (Secretaría de Salud, 2014). Es importante tomar en cuenta que la manifestación de los signos y síntomas no solo dependerá de la complejidad del daño neuronal debido al evento isquémico por sí mismo, sino del progresivo deterioro que se presenta durante diferentes periodos temporales (Murakami, Kondo, Kawase, Chan, 1998).

Para la evaluación de los déficits cognitivos subsecuentes al daño cerebral, es muy importante tomar en cuenta los antecedentes y conocimientos previos de cada paciente, por ejemplo: la escolaridad, la presencia de demencia previa al infarto, presencia de problemas de la vascularización corporal o algún otro tipo de alteración que comprometa los resultados; además que serán importantes para predecir la eficacia de la rehabilitación (Toole, Bhadelia, Williamson, Veltkamp, 2004; Garcia, Rousell, Bugnicourt, Lamy, Canaples, Peltier, Loas, Deramond, Godefroy, 2013).

De los instrumentos que permiten identificar el deterioro cognitivo, los que se utilizan con mayor frecuencia son: el manual de diagnóstico y estadística de trastornos mentales quinta edición (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition (DSM-V), la Mini escala de examinación del estado mental

(Mini-Mental State Examination (MMSE)), Evaluación cognitiva Montreal (Montreal Cognitive Assessment (MoCA)). (Al-Qazzaz, Ali, Ahmad, Islam, 2014).

La mayoría de las evaluaciones cognitivas se deben realizar alrededor de 3 meses posteriores al infarto, pues se asume que para ese punto todos los síntomas transitorios como la presencia de: dolor de cabeza, *delirium*, déficits motores, sensitivos o daño visual, que se producen debido factores propios del proceso de muerte celular y que pueden afectar los resultados de la evaluación han desaparecido (Talellia, Ellula, Terzish, Lekkac, Gioldasisa, Chrysanthopouloub, Papapetropoulos, 2006). Aunque Whyte, Skidmore, Aizenstein, Ricker, Butters (2011) demostraron alteraciones cognitivas hasta un año posterior a la fecha del infarto, indicando que el deterioro cognitivo puede propiciar el desarrollo de demencia vascular (DV). La DV es considerada el segundo tipo de demencia más común después de la demencia tipo Alzheimer (Al-Qazzaz y cols., 2014). Más del 25% de las personas que presentan una enfermedad cerebrovascular pueden desarrollar demencia, es más común en personas que tienen alrededor de 75 años o más y se presenta con mayor frecuencia en varones (Stroke Association, 2012). Sin embargo, la demencia representa sólo una porción de los trastornos de la disfunción cognitiva asociada a alguna enfermedad cerebrovascular, en algunos casos, existen pacientes que desarrollan trastornos cognitivos que no encajan completamente en los criterios de diagnóstico tradicionales, por lo cual debido a la heterogeneidad de la población, la DV puede clasificarse en subtipos: 1) predominantemente cortical, 2) focalizada y de pequeños vasos sanguíneos, 3) subcortical, ésta última predomina en casos; cabe mencionar que para el desarrollo de la DV existen diversos factores de riesgo como: edad del paciente, sexo, factores genéticos, neuropatologías previas, entre otros (Iemolo, Duro, Rizzo, Castiglia, Hachinski, Caruso, 2009).

Las funciones cognitivas que comúnmente se encuentran afectadas son: atención, memoria de trabajo, velocidad de procesamiento, funciones ejecutivas, orientación espacial, construcción visual, juicio y razonamiento abstracto (Jin, Legge, Ostbye, Feightner, Hachinski, 2006; Al-Qazzaz y cols., 2014). Dentro de lo que se refiere a

alteraciones en el lenguaje, se ha descrito la presencia de afasia, siendo las más frecuentes la de Wernicke y la afasia global, en el aspecto somatosensorial se reporta negligencia principalmente en la modalidad táctil, mientras que en la parte motriz sobresalen las apraxias, de las cuales la construccional y la ideomotora (Bolla-Wilson, Robinson, Starkstein, Boston, Price, 1998; Hoffmann, Sacco, Mohr, Tatemichi, 1997). Las manifestaciones clínicas de las alteraciones cognitivas (Tabla 1) dependen del tamaño, localización y etiología de daño cerebral.

Región afectada	Manifestación clínica
Arteria cerebral medial izquierda	Afasia
	Mutismo
	Apraxia ideacional
	Agrafia
	Acalculia
Arteria cerebral medial derecha	Negligencia
	Fallas visoespaciales y viscoconstructivas
	Aprosodia
	Anosognosia (al color, visual asociativa, facial)
Arteria cerebral posterior	Alexia pura o hemianópica
	Amnesia
	Déficits en planeación, iniciación, monitoreo, planeación y flexibilidad mental
Arteria cerebral anterior	Debilidad contralateral en piernas
	Pérdida de sensibilidad
	Déficit en atención, motivación, iniciación y funciones ejecutivas
	Memoria (verbal, visual, declarativa, anterógrada y retrógrada)
Daño subcortical	Déficit en resolución de problemas y atención
	Confusión, confabulación y cambios de la personalidad

Tabla 1. Manifestaciones cognitivas producidas por un EVC dependientes de la zona afectada. Tomada y modificada de: Al-Qazzaz y cols. (2014).

Las alteraciones cognitivas subsecuentes a un EVC, afectan de manera significativa el estado emocional del paciente generando un estado de depresión, ansiedad y labilidad emocional que generalmente se presentan durante la etapa de recuperación o rehabilitación (Heilman, Leon, Rosenbek, 2004; Rush, McNeil,

Gamble, Luke, Richie, Albers, Brown, Brott, Meschia, 2010; Nemeth, Shurte, McTigue, Nemeroff, Neigh, 2012). Tales alteraciones generan que los pacientes desarrollen una fuerte dependencia hacia sus cuidadores para realizar sus actividades de la vida cotidiana, provocando limitaciones en el cuidado personal básico, que impide su reintegración a la vida que llevaban previa al infarto (Block, 1999; Barba, Martínez-Espinosa, Rodríguez-García, Pondal, Vivancos, Del Ser, 2000).

Modelos animales para el estudio de la isquemia cerebral aguda

Debido a la necesidad de recrear de manera controlada y metódica las causas de las enfermedades cerebrovasculares con el afán de advertir las consecuentes alteraciones presentadas en los pacientes, se ha estudiado el uso de diversos modelos animales a los cuales se les induce algún tipo de infarto cerebral, siendo los animales más comúnmente usados ratas y ratones.

Para estudiar los EVC de tipo isquémico, se han propuesto numerosas técnicas que causan reducción en el flujo sanguíneo; en general, todas producen la oclusión de alguna arteria cerebral, la duración y regiones afectadas dependerán de las características particulares de cada modelo. Al principio de los años 80's se describieron dos modelos de isquemia global desarrollados en rata que posteriormente se adaptaron a la anatomía del ratón; ambos se usan en la actualidad. El primero en desarrollarse fue el modelo de oclusión de 2 vasos sanguíneos (2VO) que se lleva a cabo por la obstrucción bilateral transitoria de ambas arterias carótidas comunes; simultáneamente suele inducirse hipotensión arterial. Posteriormente, se propuso el modelo de oclusión de 4 vasos (4VO), en donde ambas arterias vertebrales son seccionadas permanentemente y las arterias carótidas son intervenidas transitoriamente alrededor de 10 a 30 minutos en promedio (Sheng, Laskowitz, Pearlstein, Warner, 1999; Olsson, Wieloch, Smith, 2003). Sin embargo, de las mayores desventajas de ambos procedimientos es que generan variación en los resultados entre sujetos y entre cepas; al igual que al momento de realizar análisis histológicos, los datos dependen de las características concretas de la técnica utilizada, provocando dificultades metodológicas para reproducirlos (Henrich-Noack, Baldauf, Reiser, Reymann, 2008; Onken, Berger, Kristian, 2012), lo cual complica la tarea de recrear algunas de las consecuencias neurológicas que presentan los seres humanos (McBean y Kelly, 1998).

En los humanos, los eventos isquémicos comúnmente se deben a oclusiones arteriales trombóticas, las cuales son mejor simulados por modelos que provocan la oclusión arterial permanente a diferencia de aquellos que lo hacen de forma

transitoria o utilizando la técnica de isquemia-reperfusión (Love, 2003). Se debe puntualizar que el periodo de perfusión que manejan ciertos procedimientos para la inducción de isquemia cerebral resultan en un fenómeno que puede provocar más daño (a nivel celular y consecuentemente del tejido), que aquel que causa la isquemia en sí, denominándose daño por perfusión (Abela y Homer-Vanniasinkham, 2003; Allen, Castella, Buckberg, Tan, 2003), causado por la hiperperfusión compensatoria que presenta el sistema, provocando hemorragia, trombos o embolias. Asimismo, puede inducir procesos patológicos como infiltración de leucocitos y/o plaquetas, activación del complemento y ruptura de la BHE (Pan, Konstas, Bateman, Ortolano, Pile-Spellman, 2007). El tiempo que tarda en permitirse la perfusión y la duración de ésta es relevante para generar el daño por perfusión (Mao, Yang, Zhou, Stern, Betz, 1999).

Características del modelo de SSACC

La mayoría de los modelos animales tienden a reproducir las consecuencias más que las causas de la isquemia cerebral, comúnmente no se toma en cuenta que el evento de isquemia aguda es antecedido por un estado patológico en donde el cerebro está sometido a isquemia crónica, al considerar que el flujo sanguíneo se encuentra reducido de manera habitual es factible comprender la evolución, consecuencias y respuesta hacia cierto tipo de tratamiento. Dado que en humanos no existe información acerca del daño celular progresivo, fue necesario que se desarrollara un modelo animal que evalúe los efectos de la isquemia cerebral aguda, en sujetos que fueron sometidos a lo que en las personas sería equivalente a sufrir aterosclerosis (Rodríguez y cols., 2000a).

En el año 2000, Rodríguez y sus colaboradores, propusieron un modelo de isquemia cerebral aguda en ratones, que se induce por medio de la oclusión bilateral permanente secuencial de arterias carótidas comunes (SSACC). Después de inducir un sutil estado de anestesia, se realiza una incisión en la línea central del cuello que permite exponer la arteria carótida izquierda y seccionarla entre ligaduras, finalmente la incisión se cierra por suturas quirúrgicas; treinta y dos días

después se realiza el mismo procedimiento en la arteria carótida común derecha. Se observó que después del seccionamiento de la carótida izquierda hubo un importante incremento en el diámetro de las arterias del polígono de Willis (excepto en la arteria cerebral posterior), siendo indicador de la respuesta compensatoria a la supresión del aporte sanguíneo que proveía la carótida interna izquierda. Dado el periodo transcurrido entre la primera y la segunda cirugía se permite establecer un estado de hipoperfusión cerebral en el organismo, sometiéndolo a un estado de irrigación sanguínea alterado previo a la fase aguda del infarto, favoreciendo que el sistema del animal presente mayor similitud con las características de los pacientes (Rodríguez y cols., 2000a). El establecimiento de 32 días como rango para realizar la segunda cirugía se determinó debido a que los animales presentaban mayor índice de supervivencia al compararse con un intervalo de 8, 16 y 24 días posteriores a la primer intervención (Rodríguez y cols., 2000a).

Una de las dificultades al momento de intentar trasladar los hallazgos encontrados en los modelos animales hacia la clínica se debe a problemas metodológicos, pues los humanos presentan numerosos factores que se deben considerar como son las enfermedades previas, la etiología, locación, la severidad del daño, etc. La edad del paciente incrementa el riesgo de presentar un EVC, por lo cual, precisamente una de las ventajas que ofrece el modelo de SSACC es el uso de animales de 40 a 60 semanas de edad, especialmente porque el uso de animales jóvenes en otros paradigmas ha sido bastante controversial.

Al momento de cuestionar la validez del uso de animales para estudios preclínicos y pretender transportar dichos resultados hacia la clínica, se han utilizado análisis histológicos como método cuantitativo para determinar el tamaño del infarto, pues se considera esencial para determinar el efecto de la isquemia y pronosticar la recuperación de los sujetos. En el modelo de SSACC se observaron zonas de infarto en la corteza frontoparietal, estriado e hipocampo derecho (CA1, CA2, CA3 y CA4), siendo menos frecuente el daño en el núcleo septal, hipocampo izquierdo (CA1 y CA2) y corteza occipital (Rodríguez, Gerson, Santiago-Mejía, 2000b).

No obstante, la información que aporta la evaluación histológica no es suficiente para establecer un plan de intervención (Schaar, Brenneman, Savitz, 2010), es de vital importancia que se conozca el correlato conductual de las alteraciones funcionales que presentan los sujetos.

Caracterización conductual

En ratones sometidos a la técnica de SSACC, se describió un patrón consistente de alteraciones neurológicas que presentan los sujetos consecuentemente a la inducción de isquemia aguda, las principales modificaciones conductuales encontradas son: postura encorvada, posición corporal lateralizada, lentitud de movimiento, pasividad, incoordinación motora, marcha tambaleante, torsión lateral, decremento de la respuesta al estímulo, decremento del tono corporal, debilidad en las extremidades posteriores que en la mayoría de los casos se presenta con ataxia, decremento de actividad locomotriz o completa inmovilidad y estrés respiratorio. Las modificaciones que presentaron la mayoría de los sujetos fueron: locomoción rígida, irritabilidad, tremor, convulsiones, rotación e incontinencia urinaria (Rodríguez, Santiago-Mejía, Gómez, Ramírez San-Juan, 2005).

Dado que la mayoría de los trastornos identificados son de carácter motor, se procedió a realizar un análisis de funcionalidad motriz utilizando una prueba de nado, en la que se cuantificó el tiempo que los ratones tardaban en nadar y trepar a una cierta plataforma, evaluándose: la distancia recorrida, la velocidad y el porcentaje corporal de flotación, se observaron alteraciones estadísticamente significativas en los animales sometidos a SSACC al compararlos con el grupo control, permitiendo concluir que el daño cerebral se manifiesta en tareas conductuales sencillas (Gómez, Delgado-García, Santiago-Mejía, Ventura-Martínez, Parra-Gámez, González-Ríos, Rodríguez, 2013).

Para evaluar la presencia de déficits en la habilidad motora fina y en la coordinación, se estableció una prueba de consumo de semillas de girasol, dicha conducta requiere que los animales tengan la capacidad de realizar una secuencia

de movimientos de manera precisa, ordenada y coordinada. Como resultado, aquellos sujetos que fueron sometidos a SSACC presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de ejecución de la tarea al ser comparados con el grupo control. Se presentaron alteraciones en el movimiento de miembros superiores y falanges, que en algunos casos impedían completar la tarea; indicando daño en la capacidad de realizar actividades que requieren coordinación visomotriz (Gómez, Santiago-Mejía, Ventura-Martínez, Rodríguez, 2006).

Con el uso de otros modelos para la inducción de isquemia cerebral también han sido evaluadas las funciones sensoriales y motoras de los sujetos, utilizando diversos métodos conductuales como el test de chimenea, *rotarod*, esquina, removimiento del adhesivo y escalera. Dentro de los test motores utilizados de manera más frecuentemente están aquellos que valoran el uso espontáneo de extremidades, locomoción, coordinación, destreza motriz, simetría postural (Gerlai, Thibodeaux, Palmer, Campagne, Van Bruggen, 2000; Bouët, Freret, Toutain, Divoux, Boulouard, Schumann-Bard, 2007; Schaar, Brenneman, Savitz, 2010) y de manera general la función sensoriomotriz (Schallert, Fleming, Leasure, Tillerson, Bland, 2000).

Con el fin de apreciar los déficits cognitivos que se desarrollan posteriores al infarto cerebral, la mayoría de los estudios están enfocados en estimar las alteraciones en aprendizaje y memoria espacial, para lo cual, comúnmente se utilizan el laberinto acuático de Morris y laberinto radial (Nelson, Lebesse, Sowinski, Hodges, 1997; Block, 1999). De manera general, se busca identificar trastornos relacionados con funciones cognitivas, para los cuales existen tres tipos de tareas aquellas que involucran aprendizaje espacial, memoria de trabajo o procesamiento de información condicional (Hodges, Nelson, Virley, Kershaw, Sinden, 1997).

Como parte de las evaluaciones cognitivas que se han llevado a cabo en ratones sometidos al procedimiento de SSACC, se ha utilizado el laberinto en cruz elevado para identificar alteraciones en la memoria inducidos por la isquemia cerebral

aguda (Alejo-Martínez, 2011), este procedimiento ha tenido dificultades para su implementación debido a las alteraciones en el desplazamiento que presentan los sujetos, las cuales pueden deberse al compromiso motor más que a alteraciones cognitivas (Alejo-Martínez, 2011). Con el fin de minimizar dicho sesgo, se utilizó del laberinto en Y acuático para evaluar aprendizaje y memoria espacial, notando diferencias significativas después de 24 horas de la segunda cirugía al comparar ratones con SSACC contra el grupo sham. Dichas diferencias consisten en un incremento en el número de errores durante la ejecución por parte de los ratones pertenecientes al grupo con SSACC, indicando que la inducción de la isquemia cerebral mediante dicha técnica, compromete al organismo a desarrollar no solamente severas secuelas motoras, sino afectando notoriamente su cognición, particularmente los procesos de aprendizaje y memoria espacial (Hernández-Aguilar, 2013).

Si se pretende realizar algún tipo de evaluación en animales de sus habilidades cognitivas, es de vital importancia que sean tomados en cuenta los cambios en los mecanismos de conducta específicos, por lo que el análisis conductual permite observar y analizar la relación entre el comportamiento del sujeto y el ambiente en donde se desarrolla.

Aprendizaje y memoria

En el caso del aprendizaje, se generan nuevos mecanismos conductuales que pueden mantenerse a largo plazo, además de que pueden modificarse ante la información que proporcionen estímulos novedosos, permitiendo así la adaptación al entorno. Las conductas aprendidas se distinguen de conductas innatas en términos de la exposición e interacción previa con los estímulos en una situación particular (Domjan, 2008).

El aprendizaje se define como: “el cambio duradero en los mecanismos de conducta que implican estímulos y/o respuestas específicos, siendo resultado de la experiencia con dichos estímulos y respuestas o con otros similares” (Domjan, 2008).

El aprendizaje no asociativo se refiere a los cambios de conducta en relación con la presentación del estímulo de manera repetida, como el caso de la sensibilización donde el organismo incrementa la magnitud o frecuencia de aparición de una conducta; mientras que el proceso de habituación, la magnitud o frecuencia de una respuesta conductual disminuye (Domjan, 2008).

El aprendizaje asociativo, hace referencia a la relación que se establece entre dos eventos, la fuerza de asociación depende directamente de la contigüidad y la contingencia que existe entre los estímulos. La contigüidad se refiere al intervalo temporal entre la presentación del primer estímulo y la presentación del segundo estímulo, dicho intervalo debe ser breve para que exista una relación entre ambos eventos. La contingencia indica la posibilidad de aparición de cierto resultado en eventos que han sido pareados (Martínez y Moreno, 1995).

Los organismos deben de adquirir conocimiento sobre el mundo y ser capaces de modificar la conducta en función de las demandas ambientales, por lo cual, los procesos de aprendizaje y memoria se relacionan estrechamente, con el fin de llevar a cabo dicha adaptación.

La memoria es un proceso cognitivo que induce cambios en la plasticidad sináptica (Castillo y Escobar, 2011), comúnmente se presenta consecuente al aprendizaje y se define como el proceso por el que la información es codificada, almacenada y posteriormente, recuperada o evocada (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

La codificación es el proceso mediante el cual se procesa la información presentada por primera vez. Por ejemplo, cuando un organismo se presenta con un estímulo nuevo, se identifican las características como la relevancia del estímulo, el sistema sensorial que se activa, el tipo y magnitud de las respuestas y las consecuencias, son codificadas pues serán importantes cuando el organismo se enfrente al mismo estímulo o a uno parecido (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

La consolidación es el a través del cual la información presentada de manera reciente se mantiene a largo plazo, dentro de tal proceso se llevan a cabo cambios estructurales en las neuronas y las células gliales, que junto con la síntesis de proteínas y la formación de nuevas conexiones sinápticas (McGaugh, 2000; Rodríguez-Ortiz, Balderas, García-DeLaTorre, Bermúdez-Rattoni, 2012) permiten que la información se mantenga estable en el tiempo.

El almacenamiento como tal, habla del mecanismo en el que la información ha sido establecida dentro de la memoria (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

El proceso de recuperación se refiere a la utilización (evocación) de la información almacenada (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

Para el establecimiento de la memoria, Hebb propuso un mecanismo para explicar la importancia de la contigüidad temporal entre estímulos, indicando que una memoria se produce por actividad neuronal que coincide y que cuando dos células son activadas de manera concurrente y repetida, la fuerza de su conexión sináptica incrementa (Li y McNally, 2013). A tal premisa se le conoce como el postulado de Hebb, literalmente indica que:

“Cuando el axón de una célula *A* está lo suficientemente cerca como para excitar a una célula *B* y repetidamente toma parte en la activación, ocurren procesos de

crecimiento o cambios metabólicos en una o ambas células de manera que tanto la eficiencia de la célula *A*, como la capacidad de excitación de la célula *B* son aumentadas” (Siegel, Albers, Brady, Price, 2006).

Para que dicho incremento en la conexión sináptica se presente, deben existir ciertas características entre las neuronas (Siegel y cols., 2006), como son:

1. Especificidad temporal: se refiere a la fuerza de la eficacia sináptica que requieren las células presinápticas para disparar antes de las células postsinápticas.
2. Cooperatividad: se requieren varias sinapsis para producir despolarización.
3. Asociatividad: se refiere al escenario espacial donde la activación fuerte de un set de sinapsis puede promover la facilitación sináptica en la misma célula.
4. Especificidad del estímulo: la potenciación sólo se induce en la sinapsis que recibe la estimulación y no en sinapsis sin estimulación de la misma célula, es crucial, ya que garantiza la especificidad de conexiones alteradas y puede incrementar la capacidad de neuronas individuales en procesos de almacenamiento de información.

Clásicamente, se ha propuesto que el lóbulo temporal es el correlato anatómico de la memoria declarativa (Squire, 1992). Principalmente participan las cortezas: entorrinal y perirrinal. De igual manera, otras estructuras destacadas en la formación de la memoria son: hipocampo, amígdala, cuerpos mamilares, septum *pellucidum*, circunvolución de cuerpo calloso, cíngulo, ínsula y circunvolución parahipocampal (Barret y cols., 2011).

El hipocampo es una de las estructuras más estudiadas del sistema nervioso central, se ubica a lo largo del borde más interno del lóbulo temporal y se pliega hacia arriba y hacia adentro para formar la superficie inferior del asta anterior del ventrículo lateral (Barret y cols., 2011). De manera general, el hipocampo se divide en el giro dentado (GD) y los cuernos de Amón, que a su vez se subdivide en regiones CA1, CA2, CA3, CA4. Dichas áreas se conectan a través de tres vías

principales: perforante, fibras musgosas y colaterales de Schaffer (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

1. Perforante: proyecta desde la corteza entorrinal hacia las células granulosas de la circunvolución dentada.
2. Musgosas: comprenden los axones de las células granulosas y se dirige hacia las células piramidales de la región CA3 del hipocampo.
3. Colateral de Schaffer: consisten las conexiones excitadoras originales en las células piramidales de la región CA3 y que terminan en las células piramidales de la región CA1.

En 1973 Bliss y Lomo estudiaron la vía perforante del giro dentado en el encéfalo de conejos, observaron un incremento en la transmisión sináptica, posterior a un tren de estimulación breve de alta frecuencia (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007). Se demostró que cuando una sinapsis es activada de manera constante, resulta un incremento a largo plazo de la fuerza sináptica (Lledo, Hjelmstad, Mukherji, Soderling, Malenkat, Nicoll, 1995). Las modificaciones dependientes del uso inducen cambios conformacionales y fisiológicos que permiten que la información se consolide, es decir, se convierta en una memoria de largo plazo, a este proceso se le denomina potenciación a largo plazo o LTP por sus siglas en inglés (López-García, Arancio, Kandel, Baranes, 1996).

La LTP inicia cuando una neurona presináptica es despolarizada por iones de Na^+ que inducen la liberación de glutamato; en la neurona postsináptica existen receptores para glutamato como son Kainato, AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y NMDA (N-metil-D-aspartato) (Siegel, y cols, 2006). Los receptores AMPA están regulados por ligando, en este caso particular, reaccionan a glutamato y permiten el flujo de iones de Na^+ hacia el interior de la célula. Cuando los receptores NMDA detectan el cambio de voltaje, expulsan el magnesio (Mg^+) que los mantenía “obstruidos”, permitiendo un aumento en la permeabilidad del Ca^{++} , mismo que intracelularmente se acopla a la calmodulina, formando el complejo Ca^{++} /calmodulina, que incrementa el nivel de conductancia de los receptores AMPA, también se presenta la activación de la proteincinsa C y

de la MAP que fosforilan canales AMPA (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007). Esta fosforilación modifica la sinapsis y la hace capaz de soportar alrededor de 1 a 3 horas, a esto se le denomina “fase temprana de LTP” (Siegel y cols., 2006).

Para el mantenimiento de la potenciación sináptica durante periodos superiores a 3 horas, es necesaria la activación de la proteínasa A, para producir lo que se denomina “fase tardía de LTP”, durante la cual se requiere transcripción de genes y síntesis de proteínas, en el nivel de transcripción es importante mencionar a CREB, al AMPc (Siegel y cols., 2006) y al BDNF (Castillo y Escobar, 2011). El resultado es el incremento de canales AMPA y/o de nuevas espinas dendríticas, lo que conlleva a que la sinapsis quede facilitada (Siegel y cols., 2006).

Se han descrito diferentes tipos de memoria, que están relacionados con la actividad e integridad diferencial de sistemas cerebrales específicos (Fig. 7), que pueden ser distinguidos en términos del tipo de información que procesan y por los principios por los cuales operan; por lo que, la información que un organismo es capaz de recordar depende de lo que fue previamente almacenado dentro de un determinado sistema de memoria (Squire, 2004). El término de sistema cerebral se define con base en su función y su estructura, diversas estructuras localizadas en el lóbulo temporal como la región hipocampal (CA, giro dentado, complejo subicular) y las cortezas adyacentes: entorrinal, perirrinal, parahipocampal, se han identificado como importantes componentes anatómicos de los diferentes sistemas de memoria (Squire, Stark, Clark, 2004).

Se distinguen dos sistemas de memoria a largo plazo: la memoria declarativa y la no declarativa.

La memoria declarativa se refiere a la capacidad de recolección consciente de información que ocurre en un tiempo y espacio específico, permite la representación interna en modelo del mundo externo y esta representación es flexible. Se divide en memoria semántica que almacena información acerca de hechos y la memoria episódica que se encarga de los acontecimientos y la

experiencia personal, encargada de recordar un evento en el contexto en el que ocurrió (Squire, 2004).

La memoria no declarativa es rígida, en el sentido en que difícilmente se distorsiona con el paso del tiempo, debido a que se relaciona estrechamente con las condiciones de los estímulos bajo los cuales se produjo el aprendizaje (Squire, 2004). Hace referencia una gama heterogénea de habilidades y hábitos que no son accesibles a la concientización (Squire, 2009), sino que son expresadas en términos de ejecución más que de recuerdo (Squire, Stark, Clark, 2004).

Dentro de la memoria no declarativa se presentan: la sensibilización y habituación, la memoria de procedimiento y la memoria asociativa, que se encuentra implicada dentro del condicionamiento clásico y operante (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

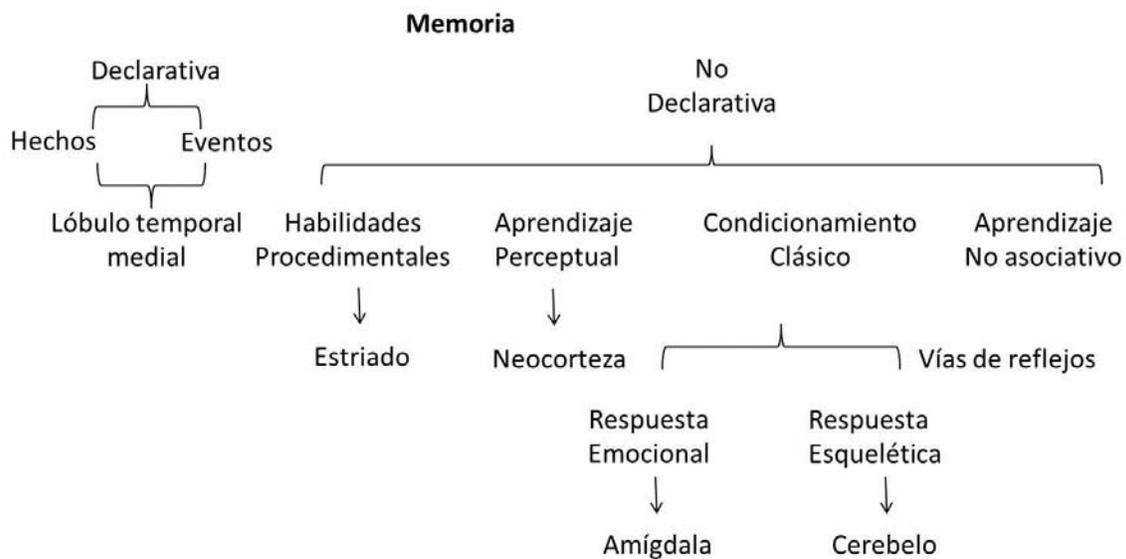


Fig. 7. Sistemas de memoria a largo plazo con estructuras cerebrales subyacentes. Tomado y modificado de Squire, 2004.

Condicionamiento Clásico

El condicionamiento clásico o Pavloviano, permite a los organismos aprender relaciones entre eventos, proporcionándoles información sobre la secuencia ordenada de los eventos en su entorno, para posteriormente iniciar la acción refleja apropiada en la anticipación de lo que está a punto de suceder. Participa

también en el aprendizaje de nuevas reacciones emocionales ante estímulos que han quedado asociados con un evento significativo (Pennanen, Welzl, D'Adamo, Nitsch, Götz, 2004).

En un experimento “estándar” de condicionamiento clásico, el sujeto recibe la presentación de un estímulo con relevancia biológica, llamado incondicionado (EI) que por sí mismo provoca una respuesta refleja, denominada incondicionada; posteriormente se parea temporal o espacialmente con un estímulo neutro (EN), es decir que no provoca la respuesta refleja. La presencia de ambos estímulos genera que el sujeto los asocie, así el EN obtiene control sobre la conducta y entonces se le llama estímulo condicionado (EC), es decir, que la presencia del estímulo favorece una respuesta condicionada (RC) (Li y McNally, 2013). Domjan (2008) sostiene que en términos experimentales, las respuestas condicionadas pueden medirse en:

- Magnitud: evaluando la cantidad de ocurrencia de una conducta.
- Probabilidad: la frecuencia relativa con la que el EC provoca una RC.
- Latencia: la rapidez con que ocurre la RC posterior a la presentación del EC.

Uno de los factores principales que determinan el curso del condicionamiento clásico es la relación temporal entre el EI y el EN. Los organismos asocian acontecimientos detectando relaciones causales en lugar de responder simplemente a la contigüidad (Domjan, 2008). Por ello, la capacidad de discernir entre estímulos relevantes de aquellos sin importancia, surge debido a la necesidad para adaptación a eventos ambientales constantemente variables. De manera innata los animales poseen la capacidad de recordar experiencias y en función de éstas modular su conducta futura (Kandel, Schwartz, Jessel, 2007).

La alimentación es una conducta esencial que presenta alta relevancia biológica, pues en un ambiente natural las oportunidades de múltiples experiencias de aprendizaje son limitadas y la rápida identificación de toxinas es primordial para la supervivencia (Núñez-Jaramillo, Ramírez-Lugo, Herrera-Morales, Miranda, 2010).

El proceso de reconocimiento del sabor incluye procesos de aprendizaje como el valor hedónico, el grado de familiaridad y las características nutritivas o tóxicas asociadas al reconocimiento de los alimentos; de igual forma la memoria asociativa permite recordar experiencias donde el sabor del estímulo se relaciona con consecuencias tras la ingestión (Yamamoto, Shimura, Sako, Yasoshima, Sakai, 1994; Bermúdez-Rattoni, 2004; Ackroff, Dym, Yiin, Sclafani, 2009).

La percepción del sabor resulta en el aprendizaje que puede ser usado como guía en el consumo futuro del alimento, dado que las experiencias de la interacción con el estímulo gustativo se asocian a las consecuencias de su ingestión (Miranda, Velázquez-Martínez, 2003; Ackroff y cols., 2009). Los dos modelos de memoria para el sabor más comúnmente usados son el test de preferencia de sabor y el condicionamiento aversivo al sabor (CAS), ambos permiten el reconocimiento de estímulos novedosos y permiten evaluar aspectos hedónicos, reforzantes o aversivos para el mismo estímulo (Núñez-Jaramillo y cols., 2010), debido a que existe un proceso subyacente de aprendizaje asociativo o condicionamiento Pavloviano.

El paradigma de preferencia de sabor se evalúa en términos de:

- Incremento del consumo: mostrando el valor hedónico (palatabilidad) y el incentivo del estímulo (expectativa) (Zukerman, Ackroff, Sclafani, 2013).
- Habitación o atenuación de la neofobia: hace referencia al incremento de la ingesta por la ausencia de consecuencias negativas posteriores a la primera presentación del estímulo (Justel y Ruetti, 2012).
- Inhibición latente: se refiere a la demora o disminución en la fuerza de asociación dentro del condicionamiento, producida por la exposición previa al evento que luego se usa como estímulo condicionado (Purves, Bonardi, Hall, 1995; Justel y Ruetti, 2012).

Los resultados se interpretan como memoria apetitiva (Bermúdez-Rattoni, 2004). La preferencia por algún sabor específico refleja una atracción natural a las cualidades particulares de éste, se sabe que los roedores presentan preferencia por sabores dulces, debido a la transmisión de las señales de reforzamiento

generadas por los sensores de glucosa, debido a que se encuentran involucradas vías neuronales que activan el sistema de recompensa dependiente de dopamina (Ackroff y cols., 2009; Beeler, McCutcheon, Cao, Murakami, Roitman, Zhuang, 2012; Zukerman, Ackroff, Sclafani, 2013).

Ante la presencia de un sabor agradable, los ratones presentan un patrón conductual característico que incluye: lengüeteo, protrusión lateral de la lengua y relamer sus patas (Fig. 8a). En contraste, las respuestas hacia el sabor aversivo incluyen: mantener la mandíbula abierta, frotarse la barbilla, sacudir la cabeza, agitar miembros anteriores, lavarse la cara y dejarse caer pasivamente (Fig. 8b) (Inui, Inui-Yamamoto, Yoshioka, Ohzawa, Shimura, 2013), además se puede observar la deglución rápida de la solución o rechazo del estímulo en la boca (Lin, Arthurs, Reilly, 2014).

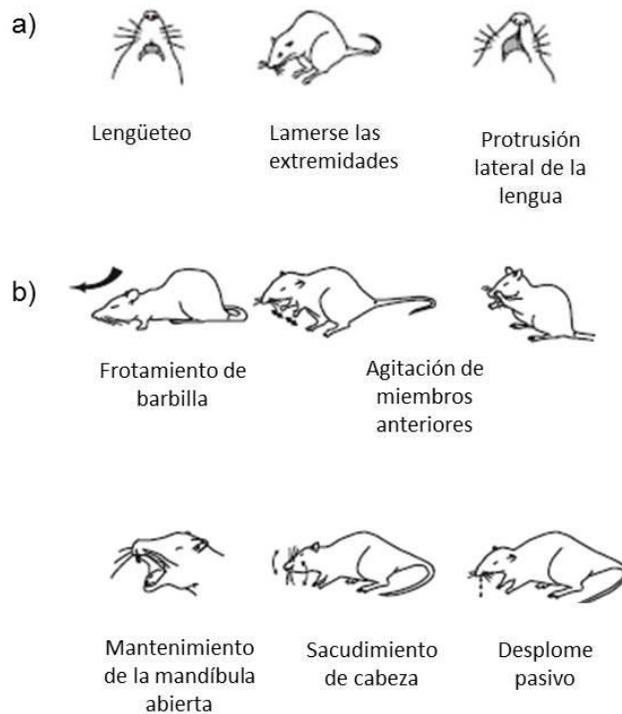


Fig. 8. Patrón conductual de respuesta ante el sabor, a) ante un sabor apetitivo, b) ante un sabor aversivo. Tomado de Inui y cols., 2013.

Condicionamiento aversivo al sabor

Los animales rápidamente aprenden a evitar consumir alimentos o líquidos cuya ingesta se asocia con consecuencias desagradables. El condicionamiento aversivo al sabor es una forma de condicionamiento clásico en donde los animales deben asociar cierto sabor con una consecuencia; al parear el sabor de un estímulo neutro con un estímulo incondicionado aversivo se modifican los mecanismos de la conducta de ingesta (Pistell, Zhuu, Ingram, 2008; Swank, 2010).

La representación neural de la memoria gustativa puede denominarse como “huella de memoria gustativa”, más que el sabor en sí, lo que se asocia con la seguridad o toxicidad del estímulo son las consecuencias post-ingesta (Núñez-Jaramillo y cols., 2010).

Reilly y Bornovalova (2005) plantean que desde un punto de vista heurístico el sujeto debe:

1. Detectar los procesos de sabor del EC
2. Detectar los procesos de información que constituyen el malestar del EI, la representación neural del EC y del EI deben ser:
3. Integrados en el aprendizaje asociativo, finalmente
4. La asociación debe ser recuperada cuando el EC se rencuentre y
5. El conocimiento debe ser expresado en la conducta.

Cuando se presentan alteraciones en el estadio 1, éstas impiden que el organismo reconozca al estímulo como novedoso y puede presentarse un proceso de inhibición latente, retardando la adquisición del condicionamiento. Lesiones en el estadio 2, frenan la capacidad de percibir la intensidad del EI. Durante el estadio 3, en la integración de la representación neural del EC y el EI, puede no integrarse la información, imposibilitando así el aprendizaje; durante el estadio 4, los sujetos son incapaces de recuperar la asociación aprendida en el momento de la evaluación. Durante el déficit del estadio 5, el sujeto es incapaz de expresar en su desempeño el conocimiento adquirido.

El CAS puede ser rápidamente adquirido, incluso en un solo ensayo y se considera un tipo de aprendizaje robusto, pues por medio del aprendizaje asociativo se establece una relación entre la ingesta del sabor determinado (EN) y el malestar gastrointestinal inducido (EI), como consecuencia se manifiesta consumo reducido de la sustancia por la evitación al sabor (RC) (Hunt, Amit, 1987; Bermúdez-Rattoni, 2004).

En condiciones experimentales, ha sido demostrado que los organismos difícilmente asocian un sabor con señales exteroceptivas (Justel y Ruetti, 2012). No obstante, las señales interoceptivas permiten la adquisición de cierta relación entre un sabor y el estado físico (Molero-Chamizo, 2007; Justel y Ruetti, 2012).

Se considera a la comida/líquido como el EC y a la aplicación de un irritante gástrico como el EI (Miranda y Velázquez-Martínez, 2003), comúnmente se utiliza la administración intraperitoneal (i.p.) de cloruro de litio (LiCl) como irritante gástrico; en un rango de 5 a 10 min posteriores, el animal manifiesta síntomas particulares como: inmovilidad, incremento del peristaltismo, diarrea e hiporreactividad a la estimulación exterior; tales síntomas remiten después de 1 o 2 horas (Molero-Chamizo, 2007).

Como EI se han utilizado numerosos agentes, incluso drogas reforzantes como: morfina, heroína, cocaína, nicotina o tetrahidrocanabinol (THC) para inducir CAS, debido a que se parte del supuesto de la discriminación de estados interoceptivos dependientes de las drogas (Verendeev y Riley, 2012).

El estudio pionero de CAS fue publicado en 1955 por John García y sus colaboradores, quienes sometieron a 6 grupos de ratas a diferentes intensidades de rayos gamma. A 3 grupos de ratas se les permitió consumir agua durante la exposición a la radiación, a los 3 grupos restantes se les permitió consumir una solución de sacarina durante la exposición a la radiación, después a los 6 grupos se les sometió a una prueba de 2 botellas una con agua y la otra con la solución de sacarina en donde los sujetos tenían la opción de decidir de cual beber. Los tres primeros grupos prefirieron consumir la sacarina en lugar del agua, mientras

que los últimos 3 grupos mostraron un rechazo por la sacarina en función de la intensidad de la radiación, el experimento demostró que la radiación actuó como El y produjo una profunda aversión a la sacarina. Demostrándose que las ratas son capaces de asociar señales gustativas con la interocepción de malestar (Miranda y Velázquez-Martínez, 2003).

El reconocimiento del sabor envuelve un proceso en el cual existen diferentes mecanismos por cuales la información sensorial puede transformarse en una memoria gustativa. La investigación en el proceso para la formación de la memoria, ha probado que la codificación, almacenamiento y recuperación se debe a actividad neural plástica en una red distribuida en diversas áreas cerebrales (Molero-Chamizo, 2007).

La formación de memoria al sabor inicia cuando el sistema gustativo detecta la información procedente de las papilas linguales y del paladar, mediante las ramas de los pares craneales facial (VII), glossofaríngeo (XI) y vago (X) (Yamamoto, 2006; Molero-Chamizo, 2007), transmitiendo información por la parte rostral del núcleo del tracto solitario (Naor y Dudai, 1996; Reilly y Bornovalova, 2005). El núcleo del tracto solitario está dividido en una zona visceral general que proyecta a la parte lateral del mismo núcleo por medio de 2 rutas: la sub diafragmática vagal que se origina en el tracto gastrointestinal y la del área postrema del órgano circunventricular que detecta las toxinas y señales viscerales por la sangre (Herbert, Moga, Saper, 1990 en Molero-Chamizo, 2005; Reilly y Bornovalova 2005) y en una zona gustativa, que proyecta a la parte medial del núcleo parabraquial (Scalera, Grigson, Norgren, 1997; Molero-Chamizo, 2005) que se encarga de la interacción orosensorial y visceral de los estímulos responsables del CAS (Shimura, Tanaka, Yamamoto, 1997; Panguluri, Kuwabara, Kang, Cooper, Lundy, 2012). Del núcleo parabraquial, existe una vía que llega hasta el tálamo medial a la región parvocelular del núcleo posteromedial ventral, que se encarga de la comunicación con la corteza gustativa (Reilly y Bornovalova 2005; Li y Cho, 2006). Otras estructuras relacionadas también con establecimiento del CAS son: el núcleo basal magnocelular (Swank, 2000), la amígdala a la cual, se le atribuye

la decodificación de estímulos con contenido emocional (Kim, Loucks, Palmer, Brown, Solomon, Marchante, Whalen, 2011), en el caso particular del CAS, interviene principalmente la región basolateral, que contribuye a la formación del valor del estímulo y de memorias aversivas (Desgranges, Lévy, Ferreira, 2008; Bermúdez-Rattoni, Grijalva, Kiefer, Garcia, 1986; Núñez-Jaramillo y cols., 2010; Pessoa, 2011) y la corteza insular, la cual recibe proyecciones del núcleo basolateral de la amígdala y está implicada en la adquisición y almacenamiento de contenido aversivo, se ha descrito que lesiones en la corteza insular retardan la adquisición del CAS (Roman, Lin, Reilly, 2009; Bermúdez-Rattoni, McGaugh, 1991 en Castillo y Escobar, 2011). Otra de las áreas que está relacionada con la memoria gustativa es el núcleo accumbens. Se divide en dos sub-regiones: *Shell* y *core*, es éste último el implicado en la ingesta y en los procesos de aprendizaje y memoria (Justel y Ruetti, 2012). Además, de la relación con el sistema colinérgico, relacionado con el procesamiento de la memoria del sabor, pero no con la asociación entre el sabor y el malestar visceral, es decir, la neurotransmisión colinérgica se encarga de detectar, codificar y recordar el sabor novedoso más no la asociación entre estímulos (Justel y Ruetti, 2012). Por lo cual, se sugiere que es importante la integridad no sólo anatómica sino de la vía neuronal completa para que el aprendizaje sea establecido.

Condicionamiento aversivo al olor

El condicionamiento aversivo al olor (CAO) es un paradigma de condicionamiento clásico, que al igual que CAS evalúa el aprendizaje asociativo, sin embargo, el EC es un olor. Parte del supuesto de que el organismo evita la ingesta de alimentos con cierto olor particular que sea predictor de toxicidad (Miranda, Ferry, Ferreira, 2007), el aroma es una característica que incrementa la saliencia del EC (Grigoleit, Kullmann, Winkelhaus, Engler, Wegner, Hammes, Oberbeck, Schedlowski, 2012). Una de las particularidades que presenta es que la asociación al olor sólo puede obtenerse si la presentación del estímulo y el malestar es inmediata (Desgranges, Lévy, Ferreira, 2008), es vital tomar en cuenta que la calidad e intensidad del olor

determinan la aversión (Ferry, Herbeaux, Cosquer, Traissard, Galani, Cassel, 2007). Existen 2 formas en las que el estímulo olfativo puede presentarse: distal o retronasal en donde el olor se presenta en un papel filtro o algún otro material absorbente para que se “diluya en el aire” y proximal u orthonasal en donde el olor es diluido en agua (Tovar-Díaz, González-Sánchez, Roldán-Roldán, 2011) siendo éste último el más eficaz, dado que se ha comprobado que a pesar de que la memoria al olor se decrementa rápidamente, la asociación puede mantenerse por 48 horas después de la presentación del EC, aun cuando la demora entre la presentación del aroma y el malestar sea de entre 2 a 4 h (Tovar-Díaz, González-Sánchez, Roldán-Roldán, 2011).

El aprendizaje al olor incluye un amplio sistema de regiones involucradas: el bulbo olfatorio, que con el órgano vomeronasal y trigeminal, que reciben e identifican el estímulo, es vital tomar en cuenta que la calidad e intensidad del olor determinan la aversión (Panhuber, 1982; Ferry y cols., 2007). La información llega de manera indirecta a la corteza piriforme, que procesa la información sensorial y de manera directa hasta la corteza entorrinal, la cual, proyecta hacia la corteza prefrontal e hipocampo (Ferry y cols., 2007), el cual se encarga de integrar el proceso sensorial y de establecer la memoria a largo plazo (Bermúdez-Rattoni, Coburn, Fernández, Chávez, García, 1987).

Condicionamiento aversivo potenciado al olor

Como ya se mencionó, la asociación de un olor con malestar es difícil de establecer si no se presenta inmediatamente, pese a ello, cuando se conjunta olor con un sabor, específicos se incrementa la relevancia sensorial del estímulo; este principio es el fundamento para el paradigma denominado: condicionamiento aversivo potenciado al olor (CAPO); es un aprendizaje donde un estímulo débil se presenta contiguo o simultáneo a un estímulo más fuerte y se espera que el estímulo fuerte ensombrezca al débil (Dardou, Datiche, Cattarelli, 2007). En otras palabras, el fenómeno de ensombrecimiento ocurre cuando se presentan 2 estímulos asociados con un EI, el organismo vinculará al EC con el más

destacado de ellos e ignorará al otro (Roman, Li, Reilly, 2009). El sabor puede incrementar el procesamiento del olor y subsecuentemente facilitar su asociación con el malestar (Lasiter, Deems, García, 1985).

De acuerdo con teorías de aprendizaje compuesto, la potenciación depende de la formación de una asociación entre los elementos que componen al EC, la suma de varios estímulos produce una aversión más fuerte de la que puede producir uno solo (Dorungas y Lolordo, 1991). La fuerza de asociación es crítica para cualquier tipo de condicionamiento y está en función de la relación olor/sabor malestar, incomodidad, dolor o enfermedad.

Se ha demostrado que, al combinar un componente gustativo con uno olfativo, el olor resulta ser más aversivo que el sabor (Bermúdez-Rattoni, Grijalva, Kiefer, García, 1986), no obstante la forma de presentación del olor, proximal o distal, es importante para la potenciación (Bouton, Jones, McPhillips, Swartzentruber, 1986).

Las similitudes entre la intensidad del olor y sabor son imposibles de cuantificar dado que pertenecen a diferentes modalidades sensoriales (Dardou, Datiche, Cattarelli, 2007). A pesar de que los estímulos se interpretan de manera diferente, se han registrado áreas cerebrales que desempeñan un papel importante en el CAPO. El hipotálamo, la corteza insular, la corteza olfativa, la corteza orbitofrontal y el núcleo basolateral de la amígdala durante la fase de adquisición pero no durante la recuperación (Shionoya y Datiche, 2009; Roman, Lin, Reilly, 2009; Dardou, Datiche, Cattarelli 2010).

Durante la adquisición, se presenta una reorganización de la representación del estímulo (Shionoya y Datiche, 2008), mientras que en la recuperación, tanto la información gustativa como la olfativa modulan la respuesta de ingesta, la cual, a su vez, se relaciona con el tratamiento tóxico.

Justificación

En Estados Unidos se reportó que un EVC ocurre aproximadamente, cada 40 segundos, se estima que anualmente 795,000 americanos sufren un infarto cerebral (American Stroke Association, 2014).

En México, la incidencia de las enfermedades cerebrovasculares ha incrementado considerablemente en los últimos años, convirtiéndose en la cuarta causa de defunción en el país de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Según datos del INEGI, en el año 2011 se reportaron 4, 403 defunciones por secuelas de enfermedad cerebrovascular, de las cuales 3, 925 defunciones fueron atribuidas a infarto cerebral (INEGI, 2013).

La OMS (2015), ha identificado factores de riesgo que incrementan la probabilidad de desarrollar anomalías en el flujo sanguíneo como son: obesidad, diabetes mellitus, hipertensión arterial y abuso de tabaco y/o alcohol. Lamentablemente, dichos factores de riesgo se presentan con alta prevalencia en la población mexicana. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2012), México ocupa el 2° lugar a nivel mundial en adultos que presentan obesidad, es decir, el 71.28% de la población mexicana presenta sobrepeso u obesidad; el 9.6%, ósea 6.4 millones de adultos, están diagnosticados con diabetes, mientras que el 31.5% muestra hipertensión arterial (tensión arterial sistólica ≥ 140 mmHg o tensión arterial diastólica ≥ 90 mmHg).

De manera general, se sugiere que las poblaciones más vulnerables a presentar un EVC son aquellas que habitan en los países de ingresos medios y bajos, afectando principalmente a personas cuya edad se coloca en un rango de 65 años o más (Macrae, 2011). Se ha indicado que la incidencia en población de 65 a 74 años de edad es de 83 por cada 10,000 habitantes (Ramiro, Prieto, Sardiñas, 2008). En la Ciudad de México, el número de días de estancia hospitalaria a causa de enfermedades cerebrovasculares es de 10 días en promedio, esto refleja una importante inversión por parte de las instituciones del sector salud. Durante el 2010, en Estados Unidos esta patología le causó al gobierno un gasto mayor a 73.7 billones de dólares para el tratamiento y atención de los pacientes (American

Stroke Association, 2014). Cabe destacar los pacientes no son económicamente activos y las características demográficas de la población mexicana prevén un incremento en la población de edades intermedias y avanzadas, es decir mayor población adulta y adulta mayor, lo cual implica mayor número de casos de EVC así como de otras enfermedades degenerativas (INEGI, 2009).

Ante la búsqueda de información acerca de este padecimiento con el fin de diseñar nuevos y más efectivos, programas de prevención, tratamiento y rehabilitación, se han llevado a cabo numerosos diseños experimentales a partir de modelos animales, principalmente con roedores. Dichos modelos han permitido recrear parcialmente los déficits que muestra un paciente con historial de EVC, no obstante la mayoría de ellos presentan limitaciones fundamentales como el uso de animales sanos y jóvenes aun cuando, se ha reportado que la presencia de los EVC en función de la edad, especialmente después de los 65 años y comúnmente, se presenta como consecuencia de alguna otra patología; la gran mayoría de procedimientos que se llevan a cabo en modelos animales inducen el evento vascular de manera focalizada y transitoria dificultando trasladar los hallazgos encontrados a la clínica; así como la evaluación funcional, dado que parte de parámetros cuantitativos limitando el análisis cualitativo de los pacientes (Alejo-Martínez, 2011).

Los modelos animales existentes se han enfocado a evaluar las alteraciones motoras y de memoria, principalmente memoria espacial, que presenta el organismo al ser sometido a un evento isquémico. Sin embargo, se ha dejado de lado la valoración de otras funciones cognitivas que pueden estar comprometidas por la alteración del flujo sanguíneo y la muerte celular.

En el presente trabajo se planteó evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria asociativos posteriores a la inducción de un evento isquémico agudo.

Al diseñar paradigmas que permitan evaluar el aprendizaje desde un punto de vista ecológicamente válido, se parte de la idea de que las reacciones de supervivencia son instintivas y por lo tanto más sencillas de provocar.

La evaluación se llevó a cabo por medio del paradigma de CAPO, partiendo del supuesto de que el paradigma posee un alto grado de confiabilidad intrínseca, al presentar gran validez ecológica debido sus características de asociación entre eventos, la tarea es adquirida rápidamente y se obtienen cambios graduales en la variable dependiente (Riley y Freeman, 2004; Núñez-Jaramillo y cols., 2010). Es importante la evaluación de este tipo de aprendizaje pues involucra un componente emocional en relación con el estímulo aversivo.

Las ventajas que presenta el modelo de CAPO es que la asociación entre eventos se manifiesta a pesar de que la presentación del malestar sea horas después del consumo del sabor. Es un método fácilmente replicable y no invasivo, que no requiere equipo costoso, los resultados no se comprometen en función del declive de la función motora ni de la percepción visual por parte de los sujetos (Pistell, Zhuu, Ingram, 2008). Además, permite explorar la relación anatómica y funcional del aprendizaje asociativo no dependiente de hipocampo (Stehberg y Simon, 2011).

En el CAPO, el sujeto experimental, a pesar de las alteraciones consecuentes de la isquemia debería mantener la capacidad de reconocer, aprender y evocar información en función de un alimento que es nocivo para su salud. No obstante, el CAPO no había sido utilizado como paradigma de evaluación para ratones sometidos a la inducción de isquemia cerebral, por lo que se pretendió valorar si era un paradigma viable para el análisis de las funciones cognitivas, particularmente el aprendizaje y la memoria asociativa de dichos animales.

Pregunta de Investigación

¿El uso del paradigma de condicionamiento aversivo potenciado al olor (CAPO) permite la detección de alteraciones en el aprendizaje asociativo y memoria asociativa en ratones con isquemia cerebral aguda inducida por la sección secuencial de arterias carótidas comunes (SSACC)?

Objetivo

- Objetivo general

Evaluar el aprendizaje asociativo y la memoria asociativa de ratones con isquemia cerebral aguda inducida por la sección secuencial de las arterias carótidas comunes, utilizando un paradigma de aversión potenciada al olor.

- Objetivos específicos

1. Identificar y describir el periodo de adquisición de la tarea de CAPO en los grupos experimentales: control, sham e isquemia.
2. Evaluar la capacidad de los sujetos para discriminar estímulos gustativos y olfativos que se presentan asociados a estados interoceptivos.
3. Mediante la implementación de una prueba de preferencia de consumo, comparar y analizar a los grupos experimentales: control, sham e isquemia; para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de discriminación de estímulos.
4. Valorar si el grupo isquemia, presenta déficits en la capacidad de discriminación del estímulo nocivo.

Hipótesis

H₀: Los ratones en estado de hipoperfusión cerebral no tardarán más sesiones que los sujetos del grupo sham ni que el control, en adquirir el condicionamiento aversivo.

H₁: Los ratones en estado de hipoperfusión cerebral tardarán más sesiones que los sujetos del grupo sham y que el grupo control, en adquirir el condicionamiento aversivo.

H₀: Los sujetos isquémicos no serán capaces de discriminar ni recordar los estímulos asociados al malestar durante la prueba de 2 botellas.

H₁: Los sujetos isquémicos serán capaces de discriminar y recordar los estímulos asociados al malestar durante la prueba de 2 botellas.

H₀: La ingesta del EC no presentará diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el consumo del EN.

H₁: La ingesta del EC presentará diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el consumo del EN.

H₀: La ejecución de los 3 grupos no presentará diferencias estadísticamente significativas durante las evaluaciones de 2 botellas que se realicen a lo largo del experimento.

H₁: La ejecución de los 3 grupos presentará diferencias estadísticamente significativas durante las evaluaciones de 2 botellas que se realicen a lo largo del experimento.

Método

Sujetos

Se utilizaron ratones macho de la cepa CFW Taconic de 40 semanas edad al inicio del experimento y con un peso promedio de 46 g, se les proporcionó alimento *ad libitum* (Purina Chow, St. Louis. MO), se mantuvieron con acceso libre al agua hasta iniciar las sesiones de entrenamiento y evaluación. En dichas sesiones, se les restringió el acceso al agua por 4:30 horas diarias posteriores a la sesión experimental. Los animales fueron alojados 5 ratones por cada caja-habitación de acrílico transparente de 26cm de largo x 17cm de ancho x 12cm de alto, en un bioterio que contaba con ciclo de luz-oscuridad automático de 12 h (7:00 a 19:00 h), la temperatura se mantuvo alrededor de los $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $55\pm 3\%$. Todos los experimentos se realizaron conforme a la ética experimental contenida en las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Salud, México). Se tomaron las medidas necesarias para minimizar su sufrimiento y el número de animales usados.

Antes de realizar las manipulaciones experimentales se les permitió a los ratones habituarse a las condiciones de las salas de alojamiento experimental por 6 días.

Para la implementación de la tarea conductual, se realizaron una serie de experimentos preliminares con el fin de estandarizar la tarea de CAPO. En total se llevaron a cabo 4 preliminares descritos en el Anexo.

Procedimiento

El experimento tuvo una duración total de 33 días (Fig. 9), tomando en cuenta como día 0 el día en el que se realizó la primera cirugía del método de SSACC. Se usaron tres grupos independientes: 1) grupo control (n=11): animales que no fueron sometidos a anestesia ni cirugía, 2) grupo sham (n=8): sujetos que se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico excepto por la ligadura y la sección

de las carótidas y 3) grupo isquemia (n=9): roedores a los cuales se les ligaron ambas arterias carótidas.

Primera cirugía

Anestesia: Se sometió a los sujetos a la inhalación de éter (dietil éter) introduciéndolos en un frasco de vidrio transparente, que contenía una cobertura de algodón previamente impregnada de dicho líquido, al momento de identificar visualmente el cese de movimiento y el desplome del animal, se procedió a iniciar la cirugía.

Cirugía: Después de inmovilizar al sujeto se realizó una pequeña incisión de aproximadamente 2 mm de longitud en la línea media del cuello, por la que se expuso la arteria carótida izquierda que fue seccionada por medio de ligaduras, finalmente el procedimiento culminó con la sutura de la incisión.

Al finalizar la cirugía los animales se colocaron en una sala de recuperación aproximadamente 1 hora bajo lámparas de calor para preservar la temperatura corporal, posterior al periodo de recuperación y una vez que presentaron signos estables, es decir sin aletargamiento ni locomoción alterada, se regresaron a su caja-habitación.

Entrenamiento CAPO

Durante 4 días consecutivos a los ratones se les permitió beber 10ml de agua con sacarina al 0.1%, en dicha solución se diluyeron 0.2 ml de extracto de almendra marca McCormick®. Se les permitió el acceso a la solución durante un periodo de 30 min, inmediatamente después se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) cloruro de litio (LiCl) con una concentración de 254mg/ml, que fue administrada al 2% de peso corporal.

Evaluación

24 h después de la cirugía, se realizó una prueba con el fin de evaluar la preferencia de sabor al cuantificar el consumo de los líquidos, les fueron presentadas 2 botellas una con agua y otra con solución de sacarina + almendra, durante 30 minutos. Después de la evaluación, se permitió el acceso libre al agua por 6 h para permitir a los sujetos un breve periodo de recuperación previo a la segunda cirugía.

Segunda cirugía

La anestesia, cirugía y cuidado posterior se llevaron a cabo siguiendo el método anteriormente descrito, con la diferencia que el seccionamiento de la arteria carótida en la segunda ocasión fue del lado derecho.

Evaluación

24 horas después de la segunda cirugía se realizó una evaluación de preferencia al sabor, que consistió en la presentación de dos botellas durante 30 min, se les permitió el libre acceso de 2 sustancias. Agua y agua + sacarina + esencia de almendra, se cuantificó la ingesta de cada líquido.

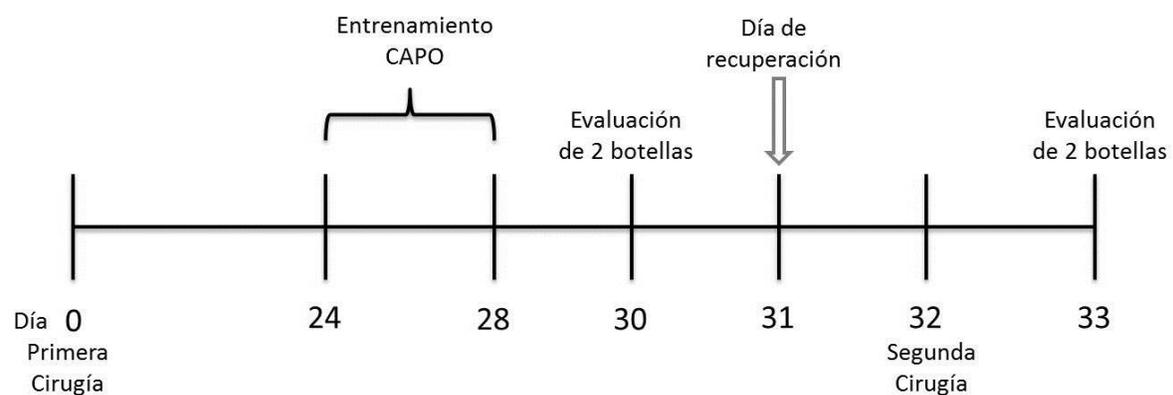


Fig. 9. Tren experimental. Se muestra el procedimiento que se utilizó en el experimento, en el día 0 se llevó a cabo la primera cirugía de seccionamiento de carótidas internas comunes, el día 24 se inició con el entrenamiento de CAPO, el cual tuvo una duración de 4 días consecutivos, el día 30 se realizó una evaluación de 2 botellas para evaluar la discriminación entre 2 estímulos. El día 32 se hizo la segunda cirugía de acuerdo al procedimiento de SSACC y el día 33 se efectuó nuevamente una prueba de 2 botellas.

Análisis estadístico

Se usó el programa estadístico GraphPad Prisma 5 para realizar el análisis de los resultados.

Se realizó una prueba de *Kolmogórov-Smirnov* para conocer si los datos se distribuyeron de manera normal, cuando fue así, se utilizó una prueba ANOVA de medidas repetidas para comparar la ingesta de líquido durante los días de entrenamiento.

Una prueba t-Student pareada para comparar el consumo durante las pruebas de 2 botellas y un ANOVA para grupos independientes son el fin de evaluar si existían diferencias en el consumo de sacarina + almendra entre los 3 grupos.

En caso de que los datos no se distribuyeran de manera normal, se efectuaron pruebas no paramétricas, específicamente una prueba de Wilcoxon para comparar la ingesta de líquidos del grupo control antes de la segunda cirugía y una prueba de Friedman para los grupos control y sham para comparar la ingesta durante la prueba de 2 botellas posterior a la segunda cirugía.

Para determinar la diferencia estadística se consideró un nivel de significancia igual a 0.05 ($\alpha=0.05$).

En todas las gráficas se muestra la media y el error estándar.

Resultados

Entrenamiento

Durante la primera fase del experimento se sometió a los sujetos a la primera cirugía del modelo SSACC, 24 días después comenzó el entrenamiento a CAPO, para los 3 grupos: 1) control (n=10), 2) sham (n=8) y 3) isquemia (n=9). Por medio de un ANOVA de medidas repetidas, se comparó el consumo de sacarina + almendra durante el transcurso del entrenamiento.

Entrenamiento grupo control

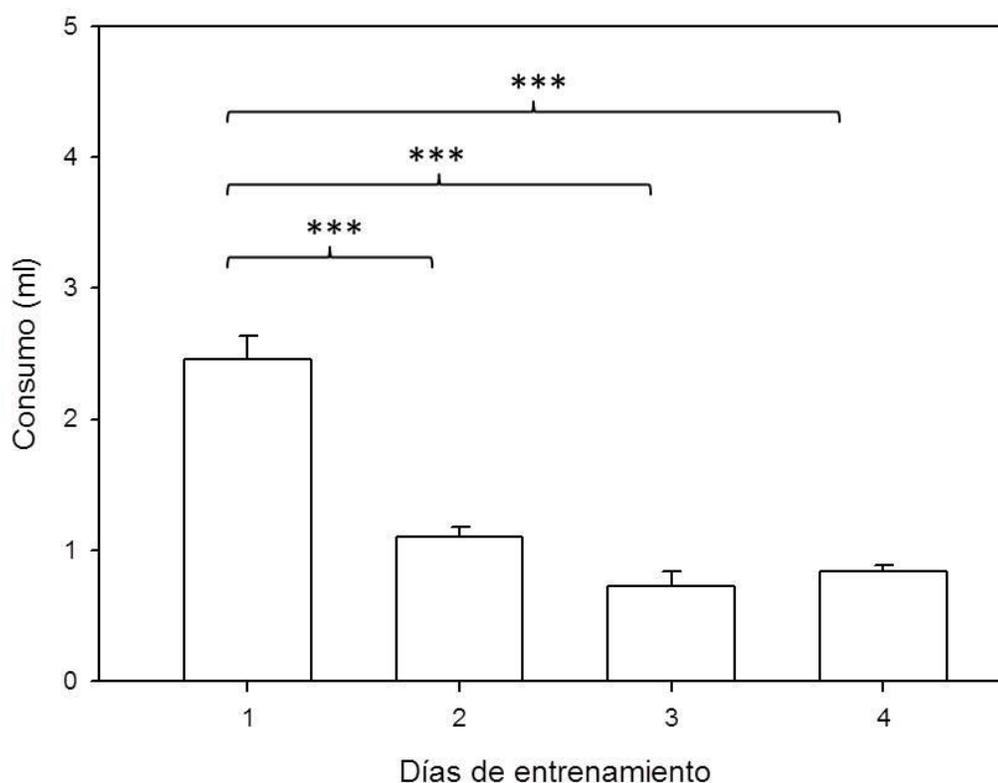


Fig. 10. Entrenamiento grupo control. Consumo de solución de agua + sacarina + esencia de almendra durante los 4 días de entrenamiento. Se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar el consumo del día 1 con los días posteriores.

En el grupo control (Fig.10), se observó disminución estadísticamente significativa en el consumo de solución de agua + sacarina + esencia ($F_{(3,9)}= 44.06$, $p < 0.0001$).

Por medio de un análisis *post-hoc* de Tukey se observó que existía diferencia en el consumo de la solución, durante los días 2, 3 y 4 comparados con el día 1.

Grupo sham: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo, no obstante se observa una tendencia a disminuir la ingesta de la solución (Fig. 11).

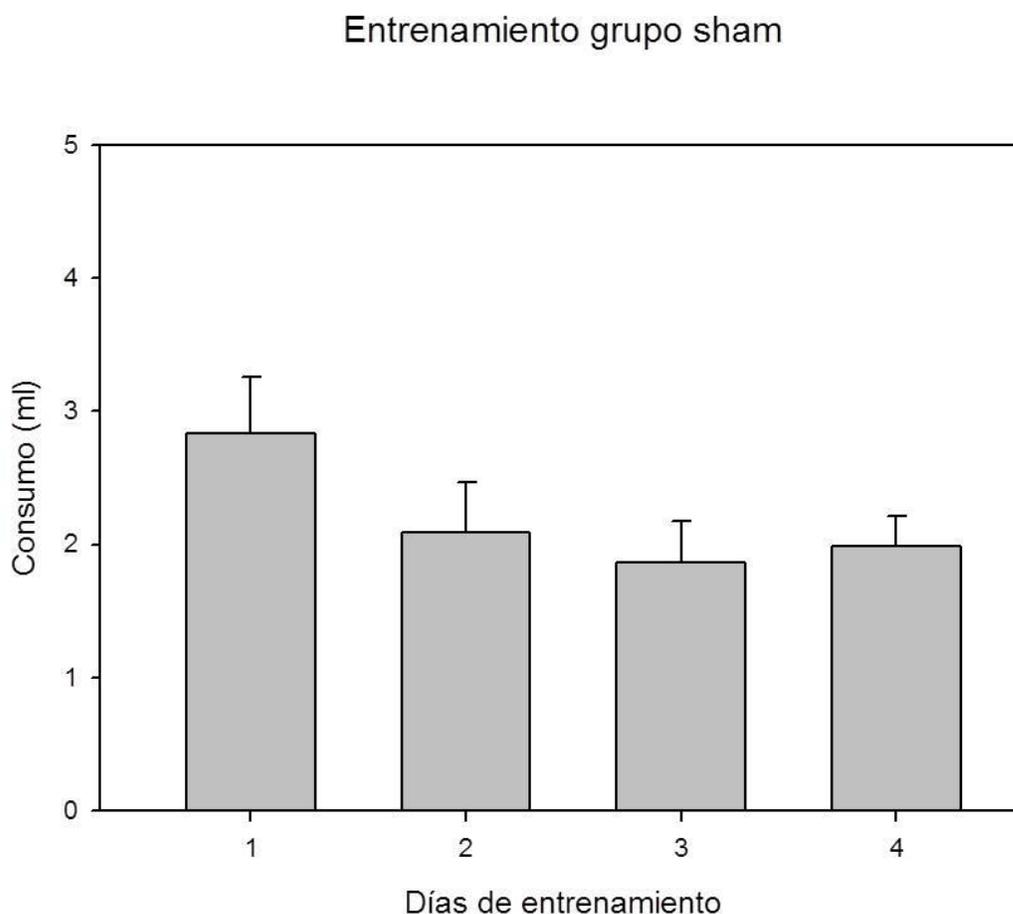


Fig. 11. Entrenamiento grupo sham. Se observó un decremento en el consumo de solución de agua + sacarina + almendra a lo largo del periodo de entrenamiento en el grupo sham, pero dicha diferencia no resultó con significancia estadística.

En el grupo isquemia (Fig. 12), se encontró diferencia en el consumo de la solución de agua + sacarina + almendra, disminuyendo significativamente ($F_{(3,8)}=8.873$, $p < 0.001$). Se realizó un análisis *post-hoc* de Tukey que mostró

diferencias entre el consumo de la solución que presentaron el día 1 comparado con los días 2 y 4.

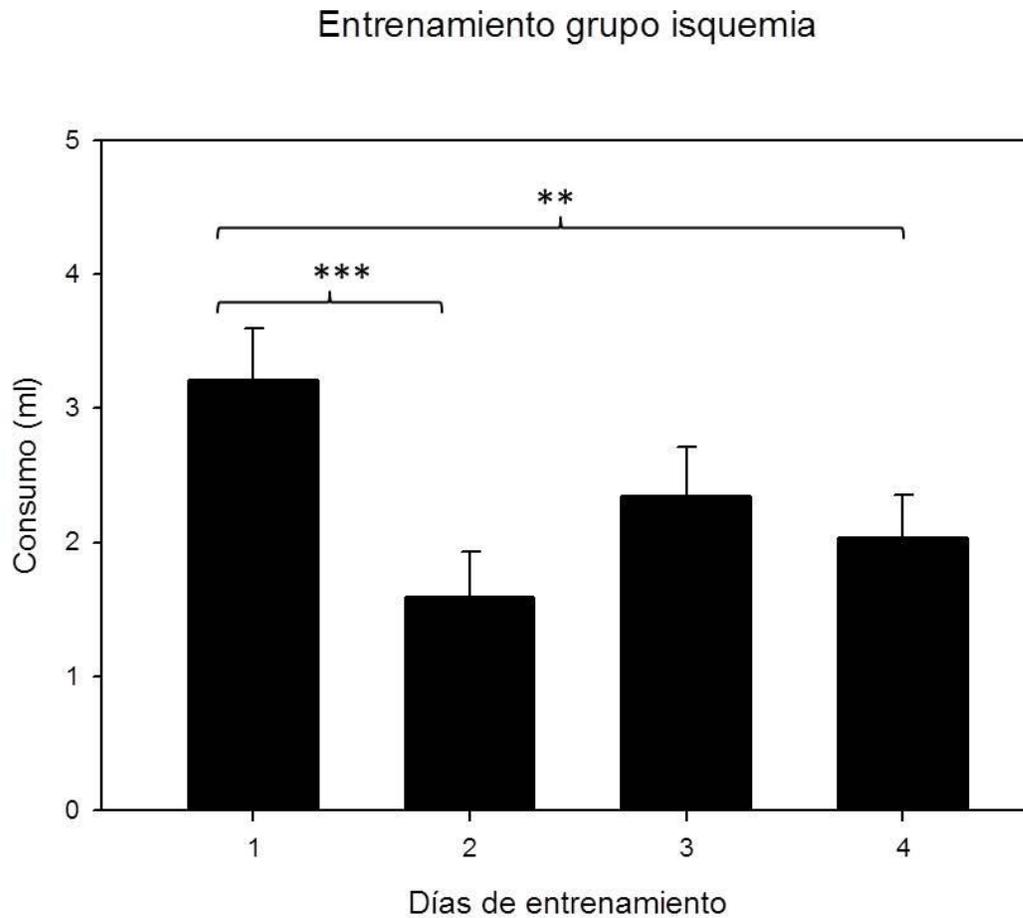


Fig. 12. Entrenamiento grupo isquemia, se presenta la ingesta de sacarina + almendra durante el entrenamiento. La diferencia entre el consumo se presenta en el día 1 comparada con el 2 y el 4.

Se realizó una comparación entre los 3 grupos para evaluar si se presentaban diferencias en el consumo por día. Entre los 3 grupos se usó una prueba ANOVA para comparar el consumo del grupo control contra el grupo sham y contra el grupo isquemia durante el primer día; se realizó la misma prueba para los días 2, 3 y 4.

En el primer y segundo día no se observaron diferencias; en el tercer día sí se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($F_{(2,24)} = 9.463$, $p < 0.001$). Una prueba de Tukey mostró que la diferencia entre el consumo de agua + sacarina +

almendra del grupo control fue menor que el consumo de los grupos sham e isquemia. En el cuarto día, también se registró diferencia estadística ($F_{(2,24)}= 9.822$, $p<0.001$), la prueba *post-hoc* de Tukey reconoció que el grupo control bebió menos que los otros 2 grupos (Fig.13).

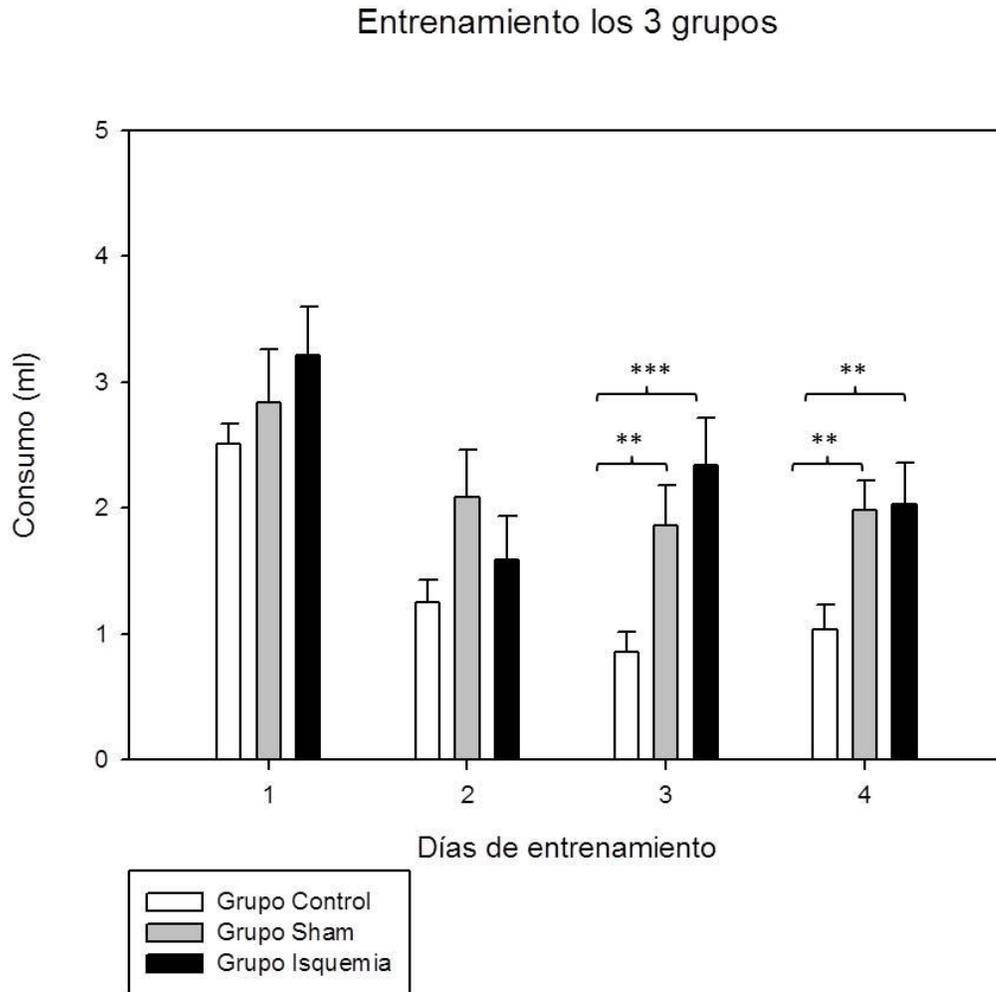


Fig. 13. Entrenamiento de los 3 grupos. Comparación entre la ingesta de EC de los 3 grupos a lo largo del periodo de entrenamiento. La diferencia entre el consumo del grupo control con los grupos sham e isquemia es estadísticamente significativa en los días 3 y 4.

Evaluación pre 2 cirugía

En la prueba de 2 botellas, dos días después del entrenamiento y antes de la segunda cirugía del modelo de SSACC, se analizaron los resultados de los grupos

a través de la prueba t-Student pareada, con el propósito de comparar el consumo de agua contra el consumo de solución de sacarina + almendra. En todos los grupos se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Fig.14). Grupo control ($t_{(9)}=4.152$, $p<0.01$), grupo sham ($t_{(7)}=3.296$, $p<0.05$) y grupo isquemia ($t_{(8)}=4.538$, $p<0.01$). Los 3 grupos bebieron más agua que agua + sacarina + almendra.

Prueba de 2 botellas pre 2° cirugía

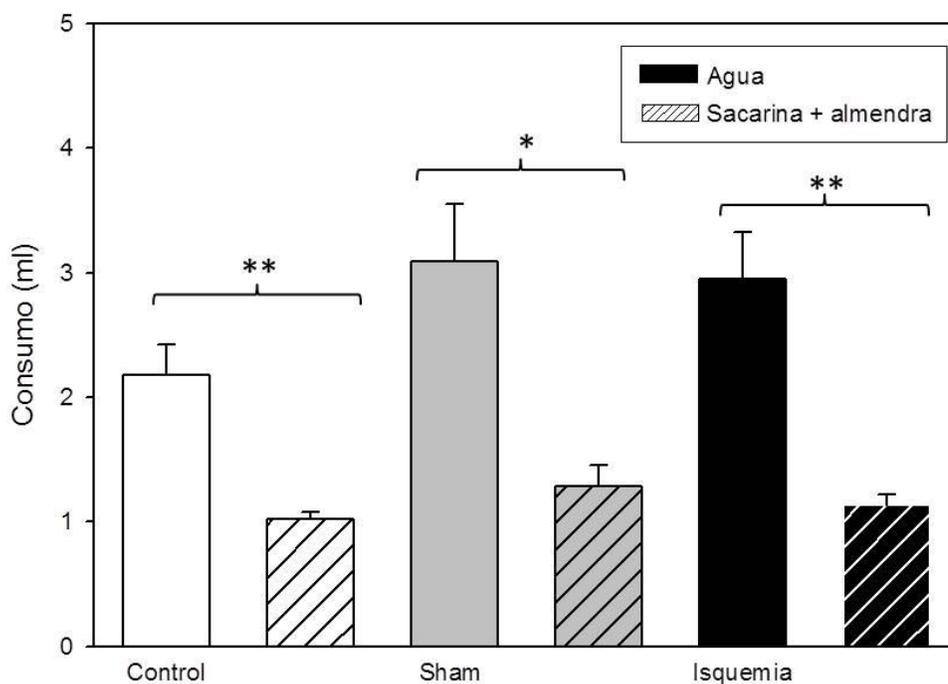


Fig. 14. Ejecución de la prueba de 2 botellas antes de la 2° cirugía, los 3 grupos presentaron diferencia estadísticamente significativa.

Evaluación post 2° cirugía

Posterior a la 2° cirugía, se realizó una prueba de 2 botellas que comparó el consumo de agua y de sacarina + almendra (Fig.15).

Para el grupo control, se realizó una prueba de Wilcoxon, que mostró que la diferencia entre el consumo de agua comparado con el consumo de sacarina + almendra fue significativa ($p<0.5$).

En el grupo sham, una prueba t-Student pareada, mostró que la diferencia entre el consumo de agua y de solución de sacarina + almendra fue estadísticamente significativa ($t_{(7)}=5.049$, $p < 0.01$).

La comparación entre la ingesta de los líquidos del grupo isquemia, se llevó a cabo por una prueba t-Student pareada que mostró no ser significativa ($t_{(8)}=1.00$, $p=0.346$).

Prueba de 2 botellas post 2° cirugía

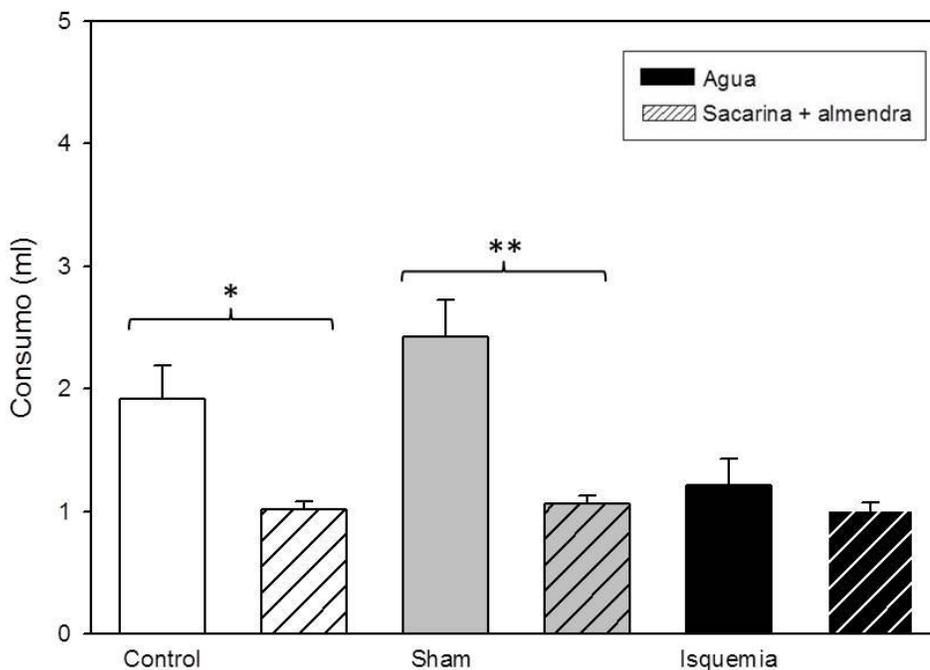


Fig. 15. Comparación entre ingesta de agua y de solución de sacarina+almendra durante la prueba de 2 botellas posterior a la segunda cirugía. Los grupos control y sham mostraron diferencia estadísticamente en el consumo.

Se comparó la ingesta de solución de sacarina + almendra de los 3 grupos por medio de una prueba ANOVA para grupos independientes, la F no fue significativa.

Con el fin de obtener un criterio más preciso a cerca del consumo de la solución de sacarina + almendra, de cada uno de los grupos, se realizó un análisis

comparativo entre el consumo de sacarina + almendra durante el último día de entrenamiento (día 4) y el consumo que presentaron durante las pruebas de 2 botellas que se llevaron a cabo pre y post 2° cirugía (Fig.16).

Para el grupo control se utilizó una prueba de Friedman, que mostró diferencias estadísticamente significativa ($F=6.353$, $p<0.05$), indicando que conforme el paso del tiempo los ratones tienden a consumir más sacarina + almendra.

En el grupo sham, también se realizó una prueba de Friedman que comparó la diferencia de la ingesta, se encontró significancia estadística ($F=9.586$, $p<0.01$), mostrando decremento en el consumo.

Dentro del grupo isquemia, un ANOVA de medidas repetidas permitió comparar la diferencia entre el consumo de sacarina + almendra y resultó ser estadísticamente significativo ($F_{(2,8)}=8.691$, $p<0.01$), una prueba *post hoc* de Tukey mostró que la diferencia se encuentra entre el consumo del último día de entrenamiento y el consumo de las 2 evaluaciones posteriores siendo estas menores a las del día 4, no obstante, no se encontró diferencia entre el consumo pre y post cirugía, tal como se describió en el apartado anterior.

Comparación del consumo de sacarina + almendra durante el último día de entrenamiento, pre y post 2° cirugía

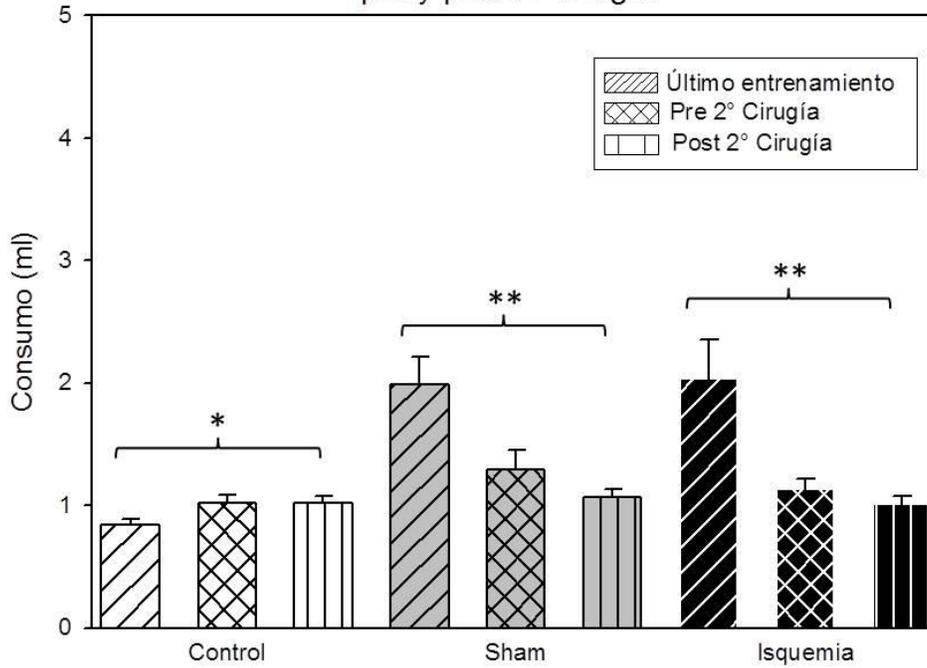


Fig. 16. Comparación entre el consumo de sacarina + almendra durante el último día de entrenamiento y el consumo durante las pruebas de 2 botellas. Los 3 grupos presentan diferencias estadísticamente significativas: control, sham e isquemia.

Discusión

Uno de los principales logros de este trabajo, fue que los experimentos preliminares permitieron la estandarización del CAPO (ver Anexo), en términos de la dosis del LiCl, concentración de sacarina y de la esencia de almendra, así como de los días de entrenamiento.

El objetivo del presente trabajo era evaluar si el uso del CAPO permitía detectar alteraciones en el aprendizaje y la memoria asociativa posterior a la inducción de isquemia cerebral aguda por el método SSACC. En este sentido, cabe destacar que durante los últimos años, se ha propuesto cambiar el término de condicionamiento aversivo a evitación condicionada, puesto que durante el entrenamiento, el animal sólo tiene 2 opciones: beber o no beber (Molero-Chamizo, 2007; Verendeev y Riley, 2012), en la prueba de 2 botellas se le permite elegir entre agua y el EC, aunque frecuentemente es posible observar cierto consumo del EC con una aversión moderada, la ingesta del sabor neutro puede no deberse necesariamente a preferencia sino a evitación del EC (Molero-Chamizo, 2007).

En el presente experimento, se logró establecer la aversión condicionada durante el mismo número de sesiones de entrenamiento para los tres grupos experimentales, a pesar de que los integrantes del grupo isquemia habían sido sometidos a una primera cirugía de seccionamiento de arteria carótida común izquierda, indicando que dicha intervención no afecta la capacidad de aprendizaje asociativo en este modelo de isquemia aguda.

Numerosos estudios indican que en aquellos modelos de inducción de isquemia cerebral en los que se pretende inducir un estado de hipoperfusión sanguínea previo al evento agudo, como es el caso del SSACC (que lo hace por etapas: primera y segunda cirugía), es común que se presente un fenómeno denominado preconditionamiento isquémico o tolerancia isquémica. La fuerza del estímulo como el tiempo de disminución en la irrigación sanguínea y la frecuencia, pueden causar diferentes niveles de neuroprotección (Galle y Jones, 2013; Trendelenburg 2014).

El preconditionamiento isquémico se ha elicitedo mediante breves periodos de isquemia, transitoria o completa, a un tejido u organismo por un periodo de tiempo sub-letal (Connolly, Bilgin-Freiert, Ellingson, Dusick, Liebeskind, Saver, González, 2013) y puede subdividirse en protección temprana, en el cual la reperfusión es inmediata y dura aproximadamente 2 h y protección tardía, donde el tejido entra a un periodo prolongado de perfusión latente (Abela y Homer-Vanniasinkham, 2003). Las formas de hipoperfusión temprana y tardía utilizan vías endógenas de señalización, que permite que los tejidos cubran sus requerimientos energéticos disminuyendo su metabolismo y por lo tanto exista una regulación más estricta la concentración ácido-base intra y extra celular (Pasupathy y Homer-Vanniasinkam, 2005; Li y Zuo, 2009). También se presenta la formación de una cicatriz gliótica y necrosis licuefactiva que impacta en aspectos de reparación endógena (Cassiani-Miranda, Borrero-Varona, 2013; Tobin y cols., 2014). En un estudio con ratones, en donde se utilizó el modelo de oclusión de la arteria cerebral media, se observó menor volumen del infarto (Tang, Pacary, Fréret, Divoux, Petit, Shumann-Bard, Bernaudin, 2006).

El preconditionamiento isquémico es una respuesta adaptativa del organismo que reduce el tamaño del infarto, puede ser ipsi o contralateral; Schumacher, Urbach, Lutzenburg, Bidmon, Witte (2014) reportan que el volumen del infarto se redujo el 27% después de preconditionamiento ipsilateral y 17.9% después del contralateral en una lesión focal inducida con oclusión permanente de la arteria cerebral media, indicando que la tolerancia isquémica es un proceso multifactorial que involucra mecanismos para inducir la neuroprotección de manera bilateral.

La tolerancia isquémica también ocurre en el cerebro humano, usualmente se presenta posterior a un TIA y es común que los pacientes no presenten graves secuelas, asimismo se reduce el tamaño del infarto y la tasa de mortalidad después de sufrir un EVC de tipo isquémico (Moncayo, Freitas, Bogousslaysky, Altieri, van Melle, 2000; Schaller, 2007). Aunque la aplicación clínica de las técnicas de preconditionamiento para el infarto son difíciles, debido a la naturaleza súbita y altamente impredecible de la isquemia (Connolly y cols., 2013).

Dado que en este trabajo, los sujetos habían sido intervenidos quirúrgicamente 24 días antes del inicio del entrenamiento, su organismo pudo haber establecido mecanismos compensatorios de perfusión sanguínea, principalmente en el polígono de Willis, tal como describen Rodríguez y colaboradores (2000a) y por ello no se observe déficit aparente en aprender la tarea.

Durante el periodo de entrenamiento, al comparar el consumo de sacarina + almendra del día 1 con el de los días posteriores, los grupos control (Fig. 10) e isquemia (Fig. 12) mostraron un decremento significativo ($p < 0.0001$) en el consumo. Por otro lado, el consumo del grupo sham presentó disminución en la ingesta pero se esperaba que la ingesta fuera similar a la que presentó el grupo control, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa, (Fig. 11), probablemente, debido a la manipulación de las arterias carótidas, los sujetos pudieron desarrollar microinfartos que alcanzaron a alterar la ejecución de la tarea; aun así los 3 grupos presentaron una clara aversión adquirida hacia la sacarina + almendra.

Se observó un fenómeno peculiar en el tercer día de entrenamiento por parte del grupo con isquemia, un incremento en el consumo del EC, que si bien no igualó a la cantidad ingerida durante el primer día sí resultó ser mayor que el consumo del día 2, pero tal diferencia no fue significativa. Se sugiere que los animales del grupo isquémico podrían presentar leves fallas cognitivas para la consolidación de la memoria, pero estas no afectan su ejecución en la tarea (Fig.12).

Al comparar el consumo entre los 3 grupos, se observó que durante los días de entrenamiento 3 y 4, los sujetos del grupo control consumieron menor cantidad de EC que los grupos sham e isquemia (Fig. 13).

Se ha reportado que el CAS puede adquirirse incluso ante una sola exposición al EC (Bermúdez-Rattoni, 2004), este experimento comprobó que el CAPO también puede adquirirse en 1 sólo ensayo, debido a que se muestra un drástico decremento en el consumo del EC que se mantiene relativamente constante durante los siguientes días de entrenamiento, no obstante, deberá evaluarse si

aun con 1 sólo día de entrenamiento los sujetos son capaces de discriminar de manera eficaz durante la prueba de 2 botellas.

Durante la prueba de 2 botellas que se realizó antes de la segunda cirugía de SSACC (Fig. 14), los 3 grupos tuvieron un desempeño que concuerda con datos obtenidos en los experimentos preliminares 3 y 4 (ver Anexo). Los sujetos de los 3 grupos consumieron mayor cantidad de agua que de sacarina + almendra, indicando que el CAPO se realizó satisfactoriamente. Estos resultados comprueban que los componentes olfativo y gustativo del estímulo, guían diferentes fases de la secuencia de ingesta, el olor es una señal distal que controla el acercamiento y el sabor es una señal proximal que regula el consumo del alimento, por lo que, cuando los estímulos se presentan simultáneamente no son redundantes y funcionan en conjunto (Bouton y cols., 1986).

La evaluación de 2 botellas posterior a la segunda cirugía, mostró que los grupos control y sham evitaron consumir la solución de sacarina + almendra, ingiriendo el agua en mayor cantidad, en contraste con el grupo isquemia que no mostró diferencia en el consumo de ambos líquidos (Fig. 15). Esto podría interpretarse como si la isquemia afectara la capacidad de los organismos de evocar la información previamente aprendida, notando que los sujetos parecen ser incapaces de discriminar entre el estímulo neutro y el estímulo que se asoció con consecuencias nocivas. Debido a que los sujetos isquémicos ejecutaban la tarea correctamente antes de la 2° cirugía no podría sugerirse que no habían consolidado el aprendizaje. Se sabe que para la consolidación es necesaria la síntesis de proteínas (Nader y Einarsson, 2010), debido a que depende de la plasticidad y cambios en las redes neurales (Dobkin, 2004); evidencia experimental muestra que cuando se administran inhibidores en la síntesis de proteínas en la amígdala basolateral, se afecta drásticamente el CAO (Helmstetter, Parsons, Gafford, 2008), no obstante, se observó que la memoria no es vulnerable a la síntesis de proteínas después del desempeño asintótico en la tarea, indicando que los procesos de almacenamiento a largo plazo y recuperación son procesos disociables; la falla en la recuperación no implica falla en la memoria

a largo plazo y tampoco impide la incorporación de nueva información a la memoria (Rodríguez-Ortiz, Balderas, García-DeLaTorre, Bermúdez-Rattoni, 2012).

Es necesario mencionar que los ratones sometidos a isquemia cerebral aguda muestran un grave deterioro motriz, a pesar de que la tarea no es exigente en términos de locomoción, probablemente el déficit motor que presentan es demasiado severo. Es muy importante tomar en cuenta el aspecto sensoriomotor al momento de realizar las evaluaciones, pues los déficits en la tarea pueden no ser necesariamente déficits cognitivos, sino que son a consecuencia de la lesión y no deberían llegar a registrarse como daños para ejecutar la tarea (Maren, Aharonov, Fanselow, 1997). En estudios previos se ha comprobado que el SSACC compromete significativamente la motricidad de los sujetos generando numerosas dificultades para realizar e interpretar las evaluaciones (Alejo-Martínez, 2011; Hernández-Aguilar, 2013).

Al comparar el consumo de sacarina + almendra en el último día de entrenamiento contra la ingesta de sacarina + almendra en las evaluaciones de 2 botellas efectuadas pre y post cirugía (Fig. 16), el grupo control mostro un incremento significativo ($p < 0.05$) en el consumo, que probablemente se debe a un proceso de habituación, mientras que los grupos sham e isquemia presentaron reducción en el consumo, la cual fue significativa ($p < 0.01$), al compararlas con el último día de entrenamiento, la cantidad ingerida durante las pruebas de 2 botellas se mantuvo relativamente constante, incluso, se nota un ligero decremento en el consumo durante la última medición (Fig. 16), indicando que los sujetos no olvidan que la ingesta de sacarina + almendra fue pareada con un resultado interoceptivo desagradable.

Se propone que el modelo de SSACC es demasiado agresivo para los organismos, una de las principales evidencias es la alta tasa de mortalidad, limitando severamente la evaluación de los animales, ya que se tienen que manejar grupos muy grandes para que al finalizar las 2 cirugías se pueda contar con un número adecuado de sujetos. De igual forma la elevada tasa de mortalidad impacta en el periodo de evaluación pues deben valorar el daño y las secuelas,

para lo cual, es importante poder apreciar la conducta en diferentes puntos temporales durante la recuperación (Schallert y cols., 2000). Sin embargo, el uso de este modelo no permite realizar evaluaciones después de los primeros 4 días, pues la mayoría de los sujetos muere dentro de dicho periodo. Aspecto que resulta un inconveniente para la evaluación conductual, se ha reportado que incluso existen sujetos que con otros métodos de inducción de isquemia pueden presentar hasta 107 días de sobrevivencia entre la cirugía y el final del experimento (Ferreira, Romanini, Cypriano, Weffort de Oliveira, Milani, 2013).

El modelo de SSACC propone el uso de éter como anestesia, el éter es un líquido volátil que fue introducido como agente anestésico en 1842. Al administrarse por inhalación puede causar irritación de la nariz y garganta, mareos, somnolencia y respiración irregular; en dosis altas puede causar decremento en la temperatura, ritmo cardíaco o pérdida del conocimiento. Se absorbe en el sistema sanguíneo y se excreta por la exhalación y por orina, aunque un poco puede alojarse en el tejido adiposo, el cual termina siendo degradado por el hígado, lo cual puede causar graves complicaciones de hepatotoxicidad (Monticelli, Kemmerling, Schulz, Keller, 2011). El éter interfiere con las propiedades de fluidez y permeabilidad de las membranas celulares (Monticelli, 2014), para su correcta administración deben utilizarse monitores que regulen la concentración y saturación en sangre, así como llevar un registro del ritmo cardíaco, del oxígeno y del CO₂ y de la temperatura corporal del organismo (Rahardjo, 2002); sin embargo, en esta investigación no se llevó a cabo tal régimen, lo cual pudo afectar tanto al grupo isquemia como al sham. Una de las ventajas de utilizar anestesia inhalable es que tiene menos impacto en los receptores de la superficie de los glóbulos rojos que los anestésicos administrados por vía intravenosa (Zhang, Liu, Zhang, Duan, 2013). No obstante, parece que el éter no afecta la tarea de CAPO, pues los sujetos fueron capaces de reconocer el componente olfativo del EC, sin embargo, podría evaluarse la implementación de otro tipo de anestesia si se pretende realizar una tarea con un componente olfativo.

La mayoría de los anestésicos exhiben propiedades neuroprotectoras, que puede no correlacionar con la potencia de la anestesia. El uso del anestésico depende de la vía de administración, los efectos colaterales y la tolerabilidad (Sanders, 2005).

El isofluorano, por ejemplo, que al igual que el éter se administra por inhalación, tiene la capacidad de modular el flujo cerebral en isquemia global y reduce la excitotoxicidad (Sanders, 2005).

Uno de los anestésicos de primera elección para roedores es el pentobarbital, usualmente se administra por vía i.p., es un barbitúrico que actúa como agonista GABAérgico, que deprime la corteza sensorial, disminuye la actividad motora, produce somnolencia, sedación e hipnosis (Rahardjo, 2002).

Evidencia señala que en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media, el uso de pentobarbital redujo el volumen del infarto en un 25% (Sanders, 2005), también se registró que al ser utilizado durante la isquemia, disminuyó el nivel de lactato (Horn y Klein, 2013), al mismo tiempo se ha visto que los barbitúricos, generalmente brindan protección contra la isquemia (Takahata y Shimoji, 1986). Por lo que, si se quiere sugerir el uso de otro fármaco, deberá tomarse en cuenta la naturaleza de la evaluación que se pretende llevar a cabo.

Otro punto importante que maneja el modelo de SSACC es el uso de animales viejos, si bien pretende que asemejarse a lo que sucede en la clínica con pacientes, es relevante mencionar que existen diferencias entre la utilización de animales jóvenes y viejos, tales diferencias deben ser tomadas en cuenta, por ejemplo las ratas jóvenes son relativamente resistentes a los efectos de la inducción de isquemia por medio del modelo 4VO a diferencia de las ratas viejas que desarrollan severos daños y disfunción cognitiva (Pereira, Díaz, Ferreira, Weffort de Oliveira, Milani, 2012).

El envejecimiento se caracteriza por un decremento en la capacidad de aprendizaje y memoria, el declive cognitivo puede ser específico o generalizado (Dardou, Datiche, Cattarelli, 2008). Se sabe que durante la vejez se presenta un decremento en la sensibilidad, coordinación y fuerza motriz, entre otras áreas

(Gaglise, Melzack, 2000). Diversos estudios han comparado la ejecución de animales jóvenes con la de animales viejos, se ha encontrado un déficit en el aprendizaje espacial que correlaciona con la edad, dependiendo de la complejidad de la tarea, los sujetos pueden tardar más sesiones de entrenamiento en poder ejecutarla correctamente (Begega, Cuesta, Rubio, Méndez, Santín, Arias, 2012), también depende de la demanda cognitiva de la tarea, por ejemplo al comparar ratas jóvenes (de 3 meses de edad) con ratas viejas (de 12 meses de edad), las viejas tardan más tiempo en ejecutar satisfactoriamente, una tarea de aprendizaje latente, no obstante en una tarea de condicionamiento clásico no hay diferencias (Stouffer y Yoder, 2011). González-Ramírez, Velázquez-Zamora, Olvera-Cortés, González-Burgos (2014) reportan que cuando ratones jóvenes son entrenados en una tarea conductual existe un incremento en la densidad de espinas dendríticas, pero no se observa el mismo fenómeno con animales viejos, este decremento contribuye a las fallas en el aprendizaje y la memoria, observados en animales viejos. Aunque en ciertas tareas los animales viejos pueden ejecutar igual que los jóvenes, en los animales viejos existe una mayor activación en regiones cerebrales relacionadas con la tarea, por lo que se sugiere que existe un declive en la eficiencia de las poblaciones neurales que subyacen a la función cognitiva (Grady, 2008).

En la presente investigación, el experimento preliminar 3, permitió comparar la ejecución de CAPO utilizando ratones jóvenes (3 meses de edad) mientras que todos los demás experimentos se llevaron a cabo con sujetos de 8 meses de edad. Se demostró que el CAPO no se altera con el envejecimiento, pues es un aprendizaje robusto con un fin de supervivencia.

Conclusión

La presente investigación demuestra que el CAPO es un paradigma que permite evaluar el aprendizaje y la memoria asociativa, una de las mayores ventajas que ofrece es que aún con sólo una sesión de entrenamiento, los animales son capaces de asociar la ingesta de un líquido con consecuencias nocivas. Las características del líquido en cuestión, que en este caso involucra componentes gustativo (sacarina) y olfativo (esencia de almendra), permiten regular de una manera más eficaz el consumo, dado que al depender de diferentes modalidades sensoriales, el sujeto puede identificar con mayor facilidad el estímulo potencialmente peligroso. La tarea en sí, posee un alto grado de confiabilidad pues evoca una conducta natural e innata que es vital para la supervivencia del organismo.

Este trabajo, utiliza el paradigma de CAPO para evaluar alteraciones cognitivas en sujetos sometidos a isquemia aguda con un modelo permanente de isquemia global.

El CAPO, como tarea para la evaluación de las alteraciones de aprendizaje y memoria asociativa en sujetos con isquemia cerebral producida por el modelo de SSACC, no presenta alteraciones durante el periodo de entrenamiento, pero sí lo hace en el desempeño de la prueba de 2 botellas posterior a la isquemia cerebral aguda; cabe mencionar que la evaluación podría proporcionar mayor información de las alteraciones cognitivas si pudiera haberse llevado a cabo en diferentes temporalidades, no obstante debido a la alta tasa de mortalidad, no fue posible efectuar tales mediciones.

Es importante tomar en cuenta la disminución en la ingesta de líquido por parte de los sujetos isquémicos, pues a pesar de que existen déficits posteriores a la inducción de isquemia aguda para ejecutar la tarea de manera satisfactoria, que pueden sugerir déficits en la capacidad de evocación y/o discriminación de estímulos por parte de los animales, estos resultados podrían deberse al compromiso motor que presentan los animales, que si bien, el requerimiento en términos de locomoción que exige la tarea no se compara con aquellos que

podiera demandar otro tipo de paradigma, es importante tomarlos en consideración para la interpretación de los resultados.

Entre las dificultades encontradas para la realización de este proyecto y las sugerencias para futuras investigaciones es importante destacar:

- Incrementar el número de animales que conforman la muestra total del grupo isquémico, aunque es importante tomar en cuenta que esto incrementaría el tiempo en el que se lleva a cabo el entrenamiento.
- Incrementar el número de animales que integran el grupo sham, ya que la variabilidad de este grupo puede deberse a las diferencias individuales de los sujetos y a los posibles microinfartos que pudieron desarrollar durante la manipulación de las arterias carótidas.
- Controlar la concentración del éter como anestésico y probar el uso de otros fármacos.
- Realizar los entrenamientos previos a la primera cirugía, hacer evaluaciones antes y después de la primera cirugía, por medio de la prueba de 2 botellas y comparar la ejecución con los resultados de esta investigación.
- Ejecutar pruebas de locomoción y motricidad para descartar a los sujetos que presenten severas alteraciones motrices como consecuencia de la isquemia.
- Aumentar el número de evaluaciones para indagar si los sujetos son capaces de discriminar otros estímulos, tanto gustativos como olfativos.
- Utilizar técnicas histológicas que permitan correlacionar el déficit conductual con alteraciones anatómicas.
- Implementar los paradigmas de CAS y CAO en diferentes grupos con el objetivo de verificar si existen diferencias en la adquisición y recuperación de la tarea cuando se presenta sólo un estímulo de una sola modalidad sensorial.
- Evaluar el efecto de un fármaco neuroprotector.

Referencias

- Abela, C., Homer-Vanniasinkham, S. (2003). Clinical implications of ischemia-reperfusion injury. *Pathophysiology*, 9 (4), 229-240.
- Ackroff, K., Dym, C., Yiin, Y., Sclafani, A. (2009). Rapid Acquisition of Conditioned Flavor Preferences in Rats. *Physiology Behavior*, 97 (3-4), 406-413.
- Alejo-Martínez, A. (2011). *Alteraciones en el aprendizaje y la memoria inducidas por isquemia cerebral aguda en la ejecución del laberinto elevado en cruz en ratones y su modificación por fármacos neuroprotectores* (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Allen, B., Castellá, M., Buckberg, G., Tan, Z. (2003). Conditioned blood reperfusion markedly enhances neurologic recovery after prolonged cerebral ischemia. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126 (6), 1851-1858.
- Al-Qazzaz, N., Ali, S., Ahmad, S., Islam, S. (2014). Cognitive assessments for the early diagnosis of dementia stroke. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1743-1751.
- American Stroke Association (2014) Recuperado de http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/Impact-of-Stroke-Stroke-statistics_UCM_310728_Article.jsp
- Arauz, A., Ruíz-Franco A. (2012). Artículo de Revisión: Enfermedad Vasculare Cerebral. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55 (3), 11-21.
- Barba, R., Martínez-Espinosa, S., Rodríguez-García, E., Podal, M., Vivancos, J., Del ser, T. (2000). Poststroke dementia: Clinical features and risk factors. *Stroke*, 31 (7), 1494-1501.
- Baron, C. (2001). Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovascular Disease*, 11 (1), 2-8.
- Barret, K., Barman, S., Boitano, S., Brooks, H. (2011). Ganong's review of medical physiology, 23^o edición, Mc Graw Hill, New York, EUA.
- Becker, L. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, 61, 461-470.
- Beeler, J., McCutcheon, J., Cao, Z., Murakami, M., Roitman, M., Zhuang, X. (2012). Taste uncoupled from nutrition fails to sustain the reinforcing properties of food. *European Journal of Neuroscience*, 36 (4), 2533-2546.
- Begega, M., Cuesta, M., Rubio, S., Méndez, L. Santín, J., Arias, L. (2012). Functional networks involved in spatial learning strategies in middle-aged rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97, 346-353.
- Bell, M., Ball, M., (1981). Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta Neuropathology*, 53, 299-318.

- Bermudez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Review Neuroscience*, 5, 209-217.
- Bermúdez-Rattoni, F., Conurn, K., Fernández, J., Chávez, F., García, J. (1987). Potentiation of Odor by Taste and Odor Aversions in Rats are Regulated by Cholinergic Activity of Dorsal Hippocampus. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 26, 553-559.
- Bermúdez-Rattoni, F., Grijalva, C., Kiefer, S., Gacía, J. (1986). Flavor-Illness Aversions: The Role of the Amygdala in the Acquisition of Taste-Potentiated Odor Aversions. *Physiology & Behavior*, 38, 503-508.
- Block, F. (1999). Global ischemia and behavioral deficits. *Progress in Neurobiology*, 58, 279-295.
- Blomgren, K., Hagberg, H. (2006). Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 388-397.
- Bolla-Wilson, K., Robinson, G., Starkstein, S., Boston, J., Price, T. (1980). Lateralization of dementia of depression in stroke patients. *American Journal of Psychiatry*, 146 (5), 627-634.
- Bouët, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M., Schumann-Bard, P. (2007). Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Experimental Neurology*, 203, 555-567.
- Bouton, M., Jones, D., McPhillips, S., Swartzentruber, D. (1986). Potentiation and Overshadowing in Odor-Aversion Learning: Role of Method of Odor Presentation, the Distal-Proximal Cue Distinction, and the Conditionability of Odor. *Learning and Motivation*, 17, 115-138.
- Cannon, C., Scannel, C., Palmiter, R. (2005). Mice lack dopamine D1 receptors express normal lithium chloride-induced conditioned taste aversion for salt but not sucrose. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2600-2604.
- Cassiani-Miranda, C., Borrero-Varona, M. (2013). Isquemia cerebral experimental y sus aplicaciones en la investigación en neurociencias. *Salud Uninorte*, 29 (3), 430-440.
- Castillo, D., Escobar, M. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behavioural Brain Research*, 217, 248-252.
- Chen, C., Liao, S., Kuo, J. (2000). Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1557-1565.
- Chen, Y., Swanson, R. (2003). Astrocytes and Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23, 137-149.
- Cipolla, M., (2009). *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; Chapter 5, Control of Cerebral Blood Flow.
- Connolly, M., Bilgin-Freiert, A., Ellingson, B., Dusick, J., Liebeskind, D., Saver, J., Gonzalez, N. (2013). Peripheral vascular disease as remote ischemic preconditioning, for acute stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115, 2124-2129.

- Cramer, W., Troop, P. (1998). Focal Cerebral Ischemia in the Mouse: Hypothermia and Rapid Screening of Drugs. *General Pharmacology*, 30 (2), 195-200.
- Dardou, D., Datiche, F., Cattarelli, M. (2007). Does taste or odor activate the same brain networks after retrieval of taste potentiated odor aversion? *Neurobiology of Learning and Memory*, 88, 186-197.
- Dardou, D., Datiche, F., Cattarelli, M. (2008). Memory is differently impaired during aging according to the learning tasks in the rat. *Behavioural Brain Research*, 194, 193-200.
- Dardou, D., Datiche, F., Cattarelli, M. (2010). Does the olfactory cue activate the same brain network during aging in the rat after taste potentiated odor aversion retrieval?. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93, 137-150.
- Desgranes, B., Lévy, F., Guillaume, F. (2008). Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory, *Brain Research*, 1236, 166-175.
- Dobkin, B. (2004). Strategies for stroke rehabilitation. *Lancet Neurology*, 3 (9), 528-536.
- Donnan, G., Fisher, M., Macleod, M., Davis, S. (2008). Stroke. *Lancet*, 371 (9624), 1612-1623.
- Domjan, M. (2008). *Principios de aprendizaje y conducta*. México: International Thompson Editores.
- Doroungas, A., Lolordo, V. (1991). Taste-Mediated Potentiation of Odor Aversion Induced by Lithium Chloride: Effects of Preconditioning Exposure to the Conditioned Stimulus and Postconditioning Extinction of the Taste Aversion. *Learning and motivation*, 22, 291-310.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012). Instituto Nacional de Salud Pública. México.
- Felger, J., Abe, T., Kaunzer, U., Gottfried-Blackmore, A., Gal-Toth, J., McEwen, B., Iadecola, C., Bulloch, K. (2010). Brain dendritic cells in ischemic stroke: Time course, activation state and origin. *Brain, Behavior and Immunity*, 24, 724-737.
- Ferreira, E., Romanini, C., Cypriano, P., Weffort de Oliveira, R., Milani, R. (2013). Sildenafil provides sustained neuroprotection in the absence of learning recovery following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. *Brain Research Bulletin*, 90, 58-65.
- Ferry, B., Herbeaux, K., Cosquer, B., Traissard, N., Galani, R., Casser, J. (2007). Immunotoxic cholinergic lesions in the basal forebrain reverse the effects of entorhinal cortex lesions on conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiology Learning Memory*, 88 (1), 114-126.
- Gaglise, L., Melzack, R. (2000). Age differences in nociception and pain behaviours in the rat. *Neuroscience Behavior Review*, 24 (8), 843-854.
- Galle, A., Jones, N. (2013). The neuroprotective actions of hypoxic preconditioning and postconditioning in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain research*, 149, 81-88.

- García, P., Rousell, M., Bugnicourt, M., Lamy, C., Canaples, S., Peltier, J., Loas, G., Deramond, H., godenfroy, O. (2013). Cognitive impairment dementia after intracerebral hemorrhage: A cross-sectional study of a hospital based series. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease*, 22 (1): 80-86.
- Gerlai, R., Thibodeaux, H., Palmer, J., Campagne, M., Van Bruggen, N. (2000). Transient focal cerebral ischemia induces sensorimotor deficits in mice. *Behavioural Brain Research*, 108, 63-71.
- Gómez, C., Delgado-García, M., Santiago-Mejía, J., Ventura-Martínez, R., Parra-Gómez, L., González-Ríos, J., Rodríguez, R. (2013). Swimming Performance: A Strategy to Evaluate Motor Dysfunction after Brain Ischemia in Mice. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 3, 584-590.
- Gómez, C., Santiago-Mejía, J., Ventura-Martínez, R., Rodríguez, R. (2006). The sunflower seed test: a simple procedure to evaluate forelimb motor dysfunction after brain ischemia. *Drug Development Research*, 67, 752-756.
- González-Ramírez, M., Velázquez-Zamora, D., Olvera-Cortés, E., González-Burgos, I. (2014). In the plastic properties of hippocampal dendritic spines underlie the attenuation of place learning in healthy aged rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 94-103.
- Grady, C. (2008). *Cognitive Neuroscience of Aging. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1124, 127-144.
- Grigoleit, J., Kullmann, J.m Winkelhaus, A., Engler, H., Wegner, A., Hammes, F., Oberbeck, R., Schedlowski, M. (2012). Single-trial conditioning in a human taste-endotoxin paradigm induces conditioned odor aversion but not cytokine responses. *Brain Behavior, and Immunity*, 26, 234-238.
- Gui, L., Duan, W., Tian, H., Li, G., Zhu, J., Chen, J., Zheng, J. (2009). Adenosine A2A receptor deficiency reduces striatal glutamate outflow and attenuates brain injury induced by transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain research*, 297, 185-193.
- Haast, R., Gustafson, D., Kiliaan, A. (2012). Sex differences in stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32, 2100–2107.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, 4^o edición. Clarendon. Londres.
- Harris, N., Gauden, V., Fraser, P., Williams, S., Parker, G. (2002). MRI measurement of blood-brain barrier permeability following spontaneous reperfusion in the starch microsphere model of ischemia. *Magnetic Resonance Imaging*, 20 (3), 221-230.
- Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., Dodd, R., Chan, P. (2004). Oxidative injury to the endoplasmic reticulum in mouse brains after transient focal ischemia. *Neurobiology of Disease*, 15, 229-239.
- Heilman, K., Leon, S., Rosenbek, J. (2004). Affective aprosodia from a medial frontal stroke. *Brain and Language*, 89 (3), 411-416.

- Helmstetter, F., Parsons, G., Gafford, M., (2008). Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning. *Neurobiology Learning Memory*, 89, 324-337.
- Henrich-Noack, P., Baldauf, K., Reiser, G., Reymann, K. (2008). Pattern of time-dependent reduction of histologically determined infarct volume after focal ischaemia in mice. *Neuroscience Letters*, 432, 141-145.
- Heo, J., Han, S., Lee, S. (2005). Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 51-70.
- Hernández-Aguilar, D. (2013). *Efecto del ambiente enriquecido en las alteraciones del aprendizaje y memoria inducidas por la isquemia cerebral aguda* (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hodges, H., Nelson, A., Virley, D., Kershaw, T., Sinden, J.(1997). Cognitive Deficits Induced by Global Cerebral Ischaemia: Prospects for Transplant Therapy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56 (4), 763-780.
- Hoffmann, M., Sacco, R., Mohr, J., Tatemichi, T. (1997). Higher cortical function deficits among acute stroke patients: The stroke data bank experience. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 6 (3), 114-1120.
- Horn, T., Klein, J. (2013). Neuroprotective effects of lactate in brain ischemia: Dependence on anesthetic drugs. *Neurochemistry International*, 62, 251-257.
- Hua, Q., Qing, X., Li, P., Li, W., Hou, J., Hu, J., Hong, Q., Sun, P., Zhu, X. (2010). Brain microvascular endothelial cells mediate neuroprotective effects on ischemia/reperfusion neurons. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 306-313.
- Hunt, T., Amit, Z. (1987). Conditioned Taste Aversion Induced by Self-Administered Drugs: Paradox Revisited. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 11, 107-130.
- Iadecola, C., Dirnagl, U., Moskowitz, M. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neuroscience*, 22 (9), 391-397.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (2009). Recuperado de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/corazon09.asp> el 16 de julio de 2014.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (2013). Recuperado de: http://www.inegi.org.mx/lib/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?proy=mo rtgral_mg el 20 de septiembre de 2014.
- Iemolo, F., Duro, G., Rizzo, G., Castiglia, L., Hachinski, V., Caruso, C. (2009). Pathophysiology of vascular dementia. *Immunity & Ageing*, 6-13.
- Inui, T., Inui-Yamamoto, C., Yoshioka, Y., Ohzawa, I., Shimura, T. (2013). Activation of efferents from the basolateral amygdala during the retrieval of conditioned taste aversion. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 210-220.
- Ishimaru, H., Ikarashi, K., Takahashi, A., Maruyama, Y. (1993). Acute neurochemical changes in mouse brain following cerebral ischemia. *European Neuropsychopharmacology*, 3, 485-449.

- Jin, Y., Legge, S., Ostbye, T., Feightner, J., Hachinski, V. (2006). The reciprocal risks of stroke and cognitive impairment in an elderly population. *Alzheimer's & Dementia*, 2, 171-178.
- Justel, N., Ruetti, E. (2012). La Memoria del Sabor. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 4 (1), 31-43.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessel, T. (2007). Principles of neuronal science. EUA: McGraw Hill.
- Ketheeswaranathan, P., Turner, N., Spary, E., Batten, T., McColl, B., Saha, S. (2011). Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia. *Brain Research*, 18, 1418, 93-103.
- Kim, M., Loucks, R., Palmer, A., Brown, A., Solomon, K., Marchante, A., Whalen, P. (2011). The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Behavioral Brain Research*, 223 (2), 403-410.
- Klohs, J., Steinbrink, J., Bourayou, R., Mueller, S., Cordell, R., Licha, K., Schirner, M., Dirnagl, U., Lindauer, U., Wunder, A. (2009). Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: A novel method for non-invasive optical imaging of blood-brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 180, 126-132.
- Lasiter, P., Deems, D., García, J. (1985). Involvement of the anterior insular gustatory neocortex in taste-potentiated odor aversion learning. *Physiology & Behavior*, 34, 71-77.
- Li C., Cho Y. (2006). Efferent projection from the bed nucleus of the stria terminalis suppresses activity of taste-responsive neurons in the hamster parabrachial nuclei. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291, 914-926.
- Li, L., Zuo, Z. (2009). Isoflurane Preconditioning Improves Short-Term And Long-Term Neurological Outcome After Focal Brain. *Neuroscience*, 164 (2), 497-506.
- Li, P., Liu, G., He, Q., Floyd, R., Siesj, K. (1999). Production of hydroxyl free radical by brain tissues in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1033-1040.
- Li, S., McNally, P. (2013). The conditions that promote fear learning: Prediction error and Pavlovian fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 108, 14-21.
- Lin, J., Arthurs, J., Reilly, S. (2014). Conditioned taste aversion, drugs of abuse and palatability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 45, 28-45.
- Lledo, P., Hjelmstad, G, Mukherji, S., Soderling, T., Malenka, R., Nicoll, R. (1995). Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (24), 11175-11179.
- López-García, J., Arancio, O., Kandel, E., Baranes, D. (1996). A presynaptic locus for long-term potentiation of elementary synaptic transmission at mossy fiber synapses in

- culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (10), 4712-4717.
- Love, S. (2003). Apoptosis and brain ischemia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 27 (2), 267-282.
- Macrae, I. (2011). Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, 164, 1062-1078.
- Mao, Y., Yang, G., Zhou, L., Stern, J., Betz, A. (1999). Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion. *Brain Research Molecular Brain Research Journal*, 63, 366-370.
- Maren, S., Aharonov, G., Fanselow, M. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 88, 261-274.
- Martínez, H., Moreno, R. (1995). El papel de la contigüidad y contingencia en el condicionamiento: una revisión y una propuesta metodológica. *Mexican Journal of Behavior Analysis*, 21, 75-106.
- Martins, F., Pereira, F., Díaz, E., Ferreira, F., Welfort, M., Milani, H. (2012). Time-course of neurodegeneration and memory impairment following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research*, 229, 340-348.
- McBean, D., Kelly, P. (1998). Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *General pharmacology*, 30 (4), 431-434.
- McGaugh, J. (2000). Memory: A century of consolidation. *Science*, 287, 248-251.
- Merwick, A., Werring, D. (2014). Posterior circulation ischaemic stroke: mice as a new model for testing neuroprotective drugs. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 9 (1), 45-53.
- Vila, J., Nieto, J. (Ed). *Investigación contemporánea en aprendizaje asociativo* (pp. 21-34). México: Del lunar.
- Miranda, M., Ferry, B., Ferreira, G. (2007). Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88, 260-263.
- Molero-Chamizo, A. (2007). Aprendizaje gustativo: Características, paradigma y mecanismos cerebrales. *Anales de Psicología*, vol. 23. (1) pp57-64. España, Universidad de Murcia.
- Moncayo, J., de Freitas, G., Bogousslavsky, J., Altieri, M., van Melle, G. (2000). Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect?. *Neurology*, 54 (11), 2089-2094.

- Monticelli, F., Kemmerling, R., Schulz, K., Keller, T. (2011). Another case of diethyl ether intoxication? A case report focusing on toxicological analysis. *Legal Medicine*, 13, 254-258.
- Monticelli, F. (2014). Diethyl Ether. *Elsevier Inc*, 2, 33-34.
- Movassaghi, S., Sharifi, Z., Soleimani, M., Joghataii, M., Hashemi, M., Shafaroodi, M., Mehdizadeh, M. (2012). Effect of Pentoxifylline on Ischemia- induced Brain Damage and Spatial Memory Impairment in Rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 15 (5), 1083-1090.
- Murakami, K., Kondo, T., Kawase, M., Chan, P., (1998). The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice. *Brain Research*, 780, 304-310.
- Murata, T., Omata, N., Fujibayashi, Y., Waki, A., Sadato, N., Yoshimoto, M., Wada, Y., Yonekura, Y. (2000). Neurotoxicity after hypoxia/ during ischemia due to glutamate with / without free radicals as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. *Brain Research*, 865, 259-263.
- Nader, K., Einarsson, E. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1191, 27-41.
- Naor, C., Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 79, 61-67.
- Nelson, A., Lebessi, A., Sowinski, P., Hodges, H. (1997). Comparison of effects of global cerebral ischaemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. *Behavioural Brain Research*, 85, 93-115.
- Nemeth, C., Shurte, M., McTigue, D., Nemeroff, C., Neigh, G. (2012). Microembolism infarcts lead to delayed changes in affective-like behaviors followed by spatial memory impairment. *Behavioural Brain Research*, 234, 259-266.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; Secretaría de Salud, 1999.
- Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., Miranda, M. (2010). Taste memory formation: Latest advances and challenges. *Behavioural Brain Research*, 207, 232-248.
- Olsson, T., Wieloch, T., Smith, M. (2003). Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Research*, 982, 260-269.
- Onken, M., Berger, S., Kristian, T. (2012). Simple model of forebrain ischemia in mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 204, 254-261.
- Onténiente, B., Rasika, S., Benchoua, A., Guégan, C. (2003). Molecular pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. *Molecular Neurobiology*, 26 (1), 22-72.

- Organización Mundial de la Salud (OMS) recuperado de http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/ el 15 de marzo de 2015.
- Organización Mundial de la salud (OMS) recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> el 29 de mayo de 2015.
- Osada, N., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y. (2010). Characterization of neuronal and astroglial responses to ER stress in the hippocampal CA1 area in mice following transient forebrain ischemia. *Neurochemistry International*, 57, 1-7.
- Pan, J., Konstas, A., Bateman, B., Ortolano, G., Pile-Spellman, J. (2007). Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology*, 49, 93-102.
- Panguluri, S., Kuwabara, N., Kang, Y., Cooper, N., Lundy, R. (2012). Conditioned taste aversion dependent regulation of amygdala gene expression. *Physiology & Behavior*, 105, 996-1006.
- Panhuber, H. (1982). Effect of odor quality and intensity on conditioned odor aversion learning in the rat. *Physiology Behavior*, 28 (1), 149-154.
- Pasupathy, S., Homer-Vanniasinkam, S. (2005). Ischaemic Preconditioning Protects Against Ischaemia/Reperfusion Injury: Emerging Concepts. *European Journal Vascular Endovascular Surgery*, 29, 106-115.
- Pennanen, L., Welzl, H., D'Adamo, P., Nitsch, R., Götz, J. (2004). Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 15, 500-509.
- Pereira, F., Díaz, E., Ferreira, F., Weffort de Oliveira, M., Milani, H. (2012). Time-course of neurodegeneration and memory impairment following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research*, 229 (2), 340-348.
- Pessoa, L. (2011). Reprint of: Emotion and cognition and the amygdala: From “what is it?” to “what’s to be done?”. *Neuropsychology*, 49, 681-694.
- Pistell, P. J., Zhu, M., Ingram, D. K. (2008). Acquisition Of Conditioned Taste Aversion Is Impaired In The Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mouse Model Of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 152, 594-600.
- Purves, D., Bonardi, C., Hall, G. (1995). Enhancement of Latent Inhibition in Rats With Electrolytic Lesions of the Hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, 109 (2), 366-370.
- Ramiro, M., Prieto, P., Sardiñas, J. (2008). Enfermedad vascular cerebral. En: Ramiro M, Lifshitz A, Halabe J, Frati A, editores. *El Internista. Medicina Interna para Internistas*. México: Nieto Editores, 1035-1047.
- Rahardjo, E. (2002). Ether, the anesthetic from 19th through 21st century. *International Congress Series*, 1242, 51-55.
- Reilly, S., Bornovalova, M. (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions: a critical review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 29 (7), 1067-1088.

- Riley, A., Freeman, K. (2004). Conditioned taste aversion: a database. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77, 655-656.
- Rodrigo, J., Fernández, A., Serrano, J., Peinado, M., Martínez, A. (2005). The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 26-50.
- Rodríguez, R., Rodríguez-Boscan, I., Lugo-Siria, D., Vidrio, H., Hong, E., Medina, M., Herrera, I. (2000a). Bilateral sequential common carotid artery sectioning in mice as a new model for testing neuroprotective drugs. *Journal of stroke cerebrovascular diseases*, 9 (1), 45-53.
- Rodríguez, R., Gerson, R. Santiago-Mejía, J. (2000b). Dexrazoxane-induced reduction in mortality in mice subjected to severe forebrain ischemia. *Drug Development Research*, 51, 149-152.
- Rodríguez, R., Santiago-Mejía, J., Gómez, C., Ramírez San-Juan, E. (2005). A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 147, 22-28.
- Rodríguez-Ortiz, C., Balderas, I., Garcia-DeLaTorre, P., Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98, 215-219.
- Roman, C., Lin, J., Reilly, S. (2009). Conditioned taste aversion and latent inhibition following extensive taste preexposure in rats with insular cortex lesions. *Brain Research*, 1259, 68-73.
- Rush, B., McNeil, R., Gamble, D., Luke, S., Richie, A., Albers, C., Brown, R., Brott, T., Meschia, J. (2010). Behavioral symptoms in long-term survivors of ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 19 (4), 326-332.
- Sánchez-Chávez, J. (1999). El área de penumbra. *Review Neurology*, 28 (8), 810-816.
- Sanders, R. (2005). Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 19 (3), 461-474.
- Scalera, G., Grigson, P., Norgren, R. (1997). Gustatory Functions, Sodium Appetite, and Conditioned Taste Aversion Survive Excitotoxic Lesions of the Thalamic Taste Area. *Behavioral Neuroscience*, 111 (3), 633-645.
- Schaar, K., Brenneman, M., Savitz, S. (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2-13.
- Schaller, B. (2007). Influence of age on stroke and preconditioning-induced ischemic tolerance in the brain. *Experimental Neurology*, 205, 9-19.
- Schallert, T., Fleming, S., Leasure, L., Tillerson, J., Bland, S. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury, *Neuropharmacology*, 39, 777-787.

- Schumacher, L., Urbacha, A., Lutzenburg, M., Bidmon, H., Witte, O. (2014). Bihemispheric ischemic tolerance induced by a unilateral focal cortical lesion. *Brain research*, 1570, 54-60.
- Secretaría de Salud, recuperado de: <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/evascularcerebral.html> el día 30 de mayo de 2015.
- Sheng, H., Laskowitz, D., Pearlstein, R., Warner, D. (1999). Characterization of a recovery global cerebral ischemia model in the mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 88, 103-109.
- Shimura, T., Tanaka, H., Yamamoto, T. (1997). Salient responsiveness of parabrachial neurons to the conditioned stimulus after the acquisition of taste aversion learning in rats. *Neuroscience*, 81 (1), 239-247.
- Shionoya, K., Datiche, F. (2009). Inactivation of the basolateral amygdala impairs the retrieval of recent and remote taste-potentiated odor aversion memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 590-596.
- Siegel, G., Albers, W., Brady, S., Price, D. (2006). *Basic Neurochemistry*. EUA: Academic Press, Elsevier.
- Snell, R. (2010). *Neuroanatomía Clínica*. EUA: Editorial Médica Panamericana.
- Sohrabji, F., Bake, S., Lewis, D. (2013). Age-related changes in brain support cells: Implications for stroke Severity. *Neurochemistry International*, 63, 291-301.
- Squire, L. (1992). Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review*, 99 (2), 195-231.
- Squire, L. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 171-177.
- Squire, L. (2009). Memory and Brain systems: 1969-2009, *Journal of Neuroscience*, 29 (41), 1271-1216.
- Squire, L., Stark, C., Clark, R. (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 279-306.
- Stehberg, J., Simon, F. (2011). Involvement of the insular cortex in retention of conditioned taste aversion is not time dependent. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95, 14-18.
- Stouffer, E., Yoder, J. (2011). Middle-aged (12 month old) male rats show selective latent learning deficit. *Neurobiology of Aging*, 32 (12), 2320.e11–2320.e14.
- Stroke association (2012). Dementia after stroke. Recuperado de: <http://www.stroke.org.uk>
- Swank, M. (2000). Phosphorylation of MAP kinase and CREB in mouse cortex and amygdala during taste aversion learning. *Neuroreport*, 11 (8), 1625-1630.
- Takahata, Y., Shimoji, K. (1986). Brain injury improves survival of mice following brain ischemia. *Brain Research*, 381 (2), 368-371.

- Talellia, P., Ellula, J., Terzisb, G., Lekkac, N., Gioldasisa, G., Tang, Y., Pacary, E., Fréret, T., Divoux, D., Petit, E., Schumann-Bard, P., Bernaudin, M. (2006). Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: Identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiology of Disease*, 21, 18-28.
- Tang, Y., Pacary, T., Fréret, T., Divoux, D., Petit, E., Shumann-Bard, P., Bernaudin, M. (2006). Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: Identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiology of Disease*, 21,18-28.
- Tobin, M., Bonds, J., Miinshall, R, Pelligrino, D., Testai, F., Lazarov, O. (2014). Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34, 1573-1584.
- Toole, J., Bhadelia, R., Williamson, J., Veltkamp, R. (2004). Progressive Cognitive Impairment After Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 13 (3), 99-103.
- Tovar-Díaz, J., González-Sánchez, H., Roldán-Roldán, G. (2011). Association of stimuli at long intervals in conditioned odor aversion. *Physiology & Behavior*, 103, 144–147.
- Trendelenburg, G. (2014). Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of uncoupled from nutrition fails to sustain the reinforcing properties of food. *European Journal of Neuroscience*, 34 (12), 1857-1867.
- Verendeev, A., Riley, A. (2012). Conditioned taste aversion and drugs of abuse: History and interpretation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 2193-2205.
- Vexler, Z., Tang, X., Yenari, M. (2006). Inflammation in adult and neonatal stroke. *Clinical Neuroscience Research*, 6, 293-313.
- Warlow, C., Sudlow, C., Dennis, M., Wardlaw, J., Sandercock, P. (2003). Stroke. *The Lancet*, 362, 1211-1224.
- Waxman, S. (2011). *Neuroanatomía Clínica*. Inglaterra: McGrawHill.
- Weis, S., Pettenuzzo, L., Krolow, R., Valentim, L., Mota, C., Dalmaz, C., Wyse, A., Netto, C. (2012). Neonatal hypoxia–ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*, 12, 271-279.
- Whyte, E., Skidmore, E., Aizenstein, H., Ricker, J., Butters, M. (2011). Cognitive Impairment in Acquired Brain Injury: A Predictor of Rehabilitation Outcomes and an Opportunity for Novel Interventions. *American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation*, 3 (6 Suppl 1), S45-S51
- Yamamoto T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology* , 69, 243-255.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y., Sakai, N. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioural Brain Research*, 65, 123-137.

Zhang, W., Liu, M., Zhang, Z., Duan, C. (2013). Effect of different anesthesia methods on erythrocyte immune function in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6 (12), 995-998.

Zukerman, S., Ackroff, K., Sclafani, A. (2013). Postoral glucose stimulation of intake and conditioned flavor preference in C57BL/6J mice: A concentration-response study. *Physiology Behavior*, 117 (109), 33-41.

Anexo

Previamente al experimento para analizar el efecto del SSACC sobre el CAPO, se realizó una serie de 4 experimentos preliminares (Pre) para identificar: 1) la concentración de LiCl efectiva como estímulo incondicionado aversivo (EI), 2) La eficacia de estímulos olfativos (esencia de almendra y vainilla) como potenciadores del EI; 3) los componentes gustativos y olfativos del CAPO y 4) la discriminación del olor y del sabor durante la prueba de 2 botellas.

Experimento Pre 1. LiCl como estímulo incondicionado aversivo.

El presente experimento permitió identificar la concentración de LiCl efectiva para provocar malestar gastrointestinal en los sujetos con el paradigma de CAS.

Se utilizaron 14 sujetos en idénticas condiciones que los utilizados en el experimento de SSACC, Se dividieron aleatoriamente en 2 grupos (n=7 c/u), ambos, fueron entrenados en el paradigma de CAS durante 3 días, utilizando como EC una solución de sacarina al 0.1% y como EI se administró (i,p.) LiCl al 2% del peso corporal del sujeto.

Los sujetos tuvieron acceso a la sacarina durante 30 min, 5 min después de concluido dicho periodo, se administró LiCl. Al grupo 1 la concentración de 12.5mg/ml y al grupo 2 la de 25.4mg/ml, de acuerdo a las concentraciones reportadas en Cannon, Scannel, Palmiter (2005).

Con el propósito de comparar el consumo de sacarina durante los 3 días de entrenamiento, se realizó una prueba ANOVA de medidas repetidas, en la que ninguno de los 2 grupos presentó diferencias estadísticamente significativas.

La evaluación de CAS consistió en la presentación de agua en una botella y una solución de agua + sacarina en la otra, se permite el acceso durante 30 min y se cuantifica la ingesta de cada líquido. Con el fin de comparar el consumo del contenido de cada una de las botellas, se utilizó un análisis t-Student pareado para

el grupo 1 y una prueba de Wilcoxon para el grupo 2. El análisis no encontró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los 2 grupos.

Al comparar el consumo de agua + sacarina del grupo 1 (consumo promedio $1.52 \text{ ml} \pm 1.08$) contra el grupo 2 (consumo promedio $1.31 \text{ ml} \pm 0.33$), por medio de una prueba t-Student para grupos independientes, tampoco se encontraron diferencias.

A pesar de que el consumo de EC no resultó ser menor en el grupo al que se le administró la concentración de 25.4 mg/ml de LiCl, se optó por utilizar dicha dosis, debido a la observación conductual que se llevó a cabo, pues los sujetos mostraban características cualitativas típicas del malestar gastrointestinal similares a las reportadas por Inui, Inui-Yamamoto, Yoshioka, Ohzawa, Shimura (2013).

Experimento Pre 2. Olor para potenciar la saliencia del estímulo.

Con el objetivo de incrementar la saliencia del EC para que los sujetos discriminaran los estímulos presentados, se optó por utilizar como EC una solución de agua + sacarina con una concentración al 0.1% + 0.2ml de esencia. De acuerdo a lo sugerido por Tovar-Díaz, González-Sánchez, Roldán-Roldán, (2011), las esencias utilizadas para este experimento fueron: almendra de la marca McCormick® y vainilla de la marca Pasa®,

Se manejaron 2 grupos, el grupo almendra ($n=6$) y el grupo vainilla ($n=7$). Ambos fueron entrenados durante 2 días, por un periodo de 30 min se les permitió el acceso a la solución de agua + sacarina + esencia, alrededor de 5 min después, a los sujetos se les administró (i.p.) LiCl con una concentración de 25.4 mg/ml , al 2% del peso corporal.

Por medio de una prueba de Wilcoxon, en ambos grupos, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al comparar el consumo de agua + sacarina + esencia durante los 2 días de entrenamiento (Fig. 17).

Entrenamiento

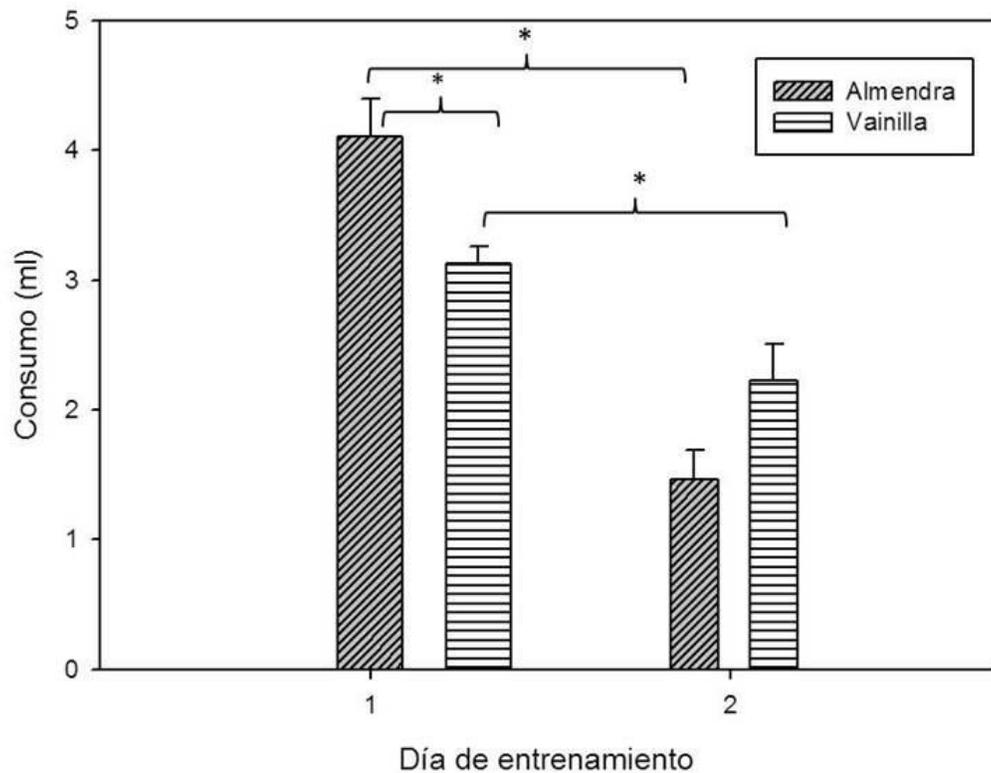


Fig. 17. Entrenamiento de grupos durante 2 días, con la presentación de una solución de agua + sacarina + esencia. En ambos grupos se observó una disminución significativa en el consumo. Se presentó mayor consumo de la solución de agua + sacarina + almendra, dicha diferencia es estadísticamente significativa al compararla con el consumo de agua + sacarina + esencia en el día 1 de entrenamiento.

Por medio de una prueba de Mann Whitney se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), al comparar el consumo de las soluciones, siendo la sacarina + almendra la de mayor consumo (Fig. 17).

En el paradigma de 2 botellas (descrito anteriormente), se cuantificó el consumo de agua contra agua + sacarina + esencia. Una prueba de Mann Whitney determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, el grupo almendra, presentó una tendencia a consumir más cantidad de agua (promedio consumo 2.05 ± 0.57 ml) por encima del otro líquido (consumo de sacarina + almendra en promedio de 0.67 ± 0.20 ml), por lo cual se decidió utilizar la esencia de almendra.

Experimento Pre 3. Componentes gustativos y olfativos del CAPO.

Dado que el paradigma de CAPO presenta componentes de 2 modalidades sensoriales distintas, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar de manera aislada los componentes gustativos y olfativos de la tarea. Además, se valora si la edad de los sujetos es un factor importante para la ejecución de la tarea.

Se utilizó un grupo (n=10) de 2 meses de edad, entrenado durante 4 días, en los cuales se les permitió el acceso durante 30 min a una solución de sacarina al 0.1% donde se diluyó 0.2ml de esencia de almendra, posterior al tiempo establecido, se administró (i.p) LiCl con una concentración de 25.4 mg/ml al 2% del peso corporal del sujeto.

A lo largo de los 4 días de entrenamiento se cuantificó la ingesta de la solución de sacarina + almendra, una prueba de Friedman que resultó estadísticamente significativa ($F=18.69$, $p<0.001$) y un análisis *post-hoc* de Dunn revelaron diferencias en el consumo de la solución al comparar el día 1 con los días posteriores (Fig. 18).

Entrenamiento

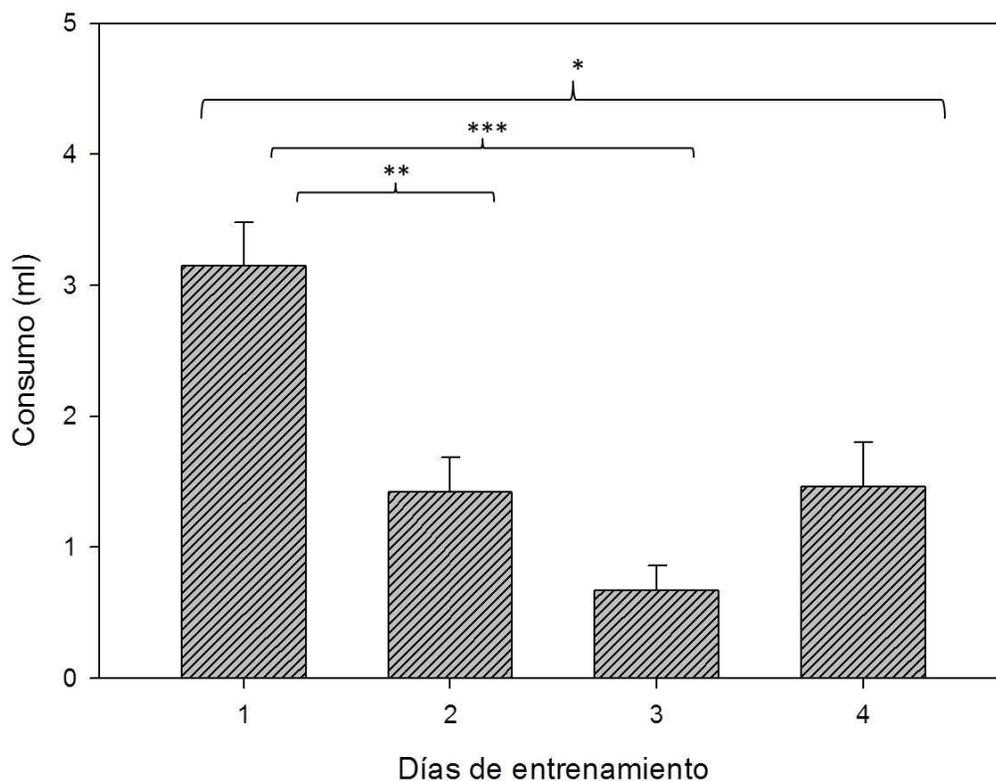


Fig. 18. Se cuantificó la ingesta de la solución de sacarina + almendra, durante 4 días de entrenamiento. Se observa diferencia estadísticamente significativa al comparar el día 1 con los días siguientes.

Con el fin de evaluar la capacidad de discriminación entre estímulos gustativos y olfativos, se realizaron una serie de pruebas de 2 botellas descritas en la tabla siguiente (Tabla 2).

Día	Botella 1	Botella 2
1	Agua	Sacarina + almendra
2	Agua	Sacarina
3	Agua	Almendra
4	Sacarina	Almendra

Tabla 2. Pruebas de dos botellas realizadas en el experimento preliminar 3.

Agua vs sacarina + almendra

Se comparó la ingesta de líquidos mediante una prueba de 2 botellas, un análisis de Wilcoxon demostró que el consumo de agua fue mayor estadísticamente ($p < 0.01$) al de sacarina + almendra (Fig. 19).

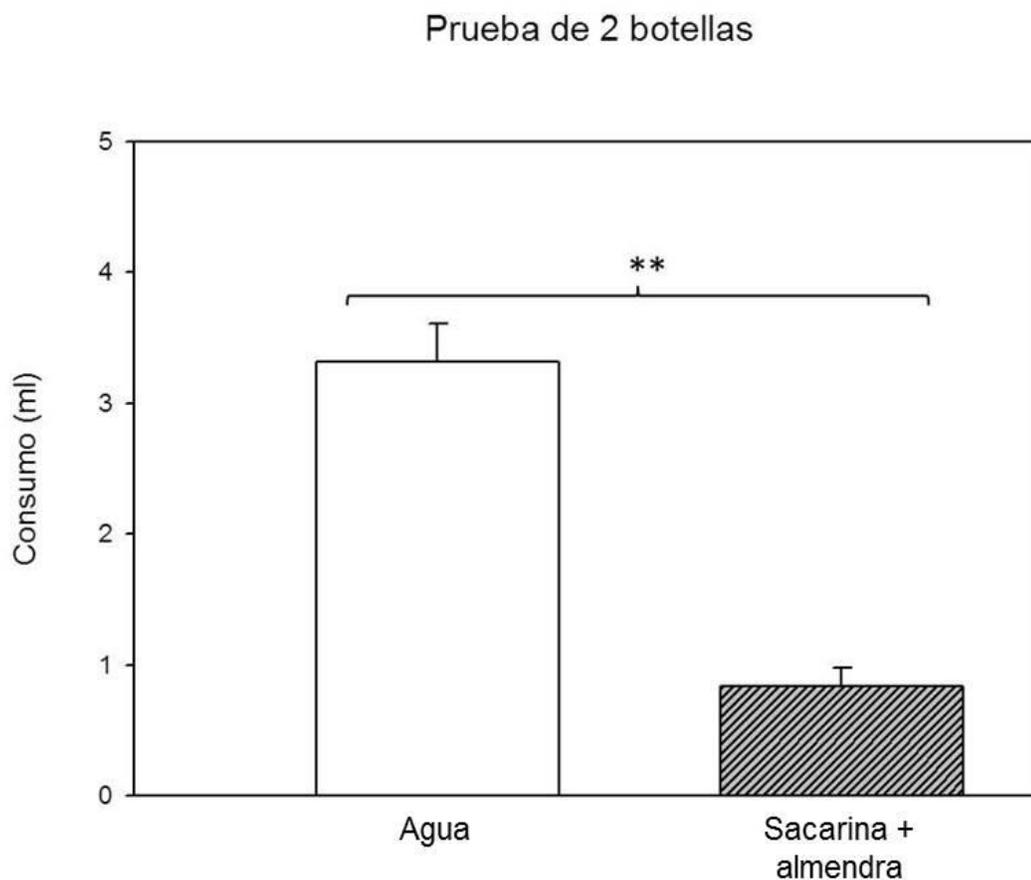


Fig. 19. Ingesta de agua y solución de sacarina + almendra, durante la prueba de 2 botellas. La diferencia es estadísticamente significativa.

Agua vs sacarina

En la prueba de 2 botellas, el consumo promedio de agua (2.05 ± 0.21) contra el de sacarina (1.75 ± 0.36), se analizó por medio de una prueba t-Student pareada, en la cual, no se observa diferencia estadística.

Agua vs Almendra

Se utilizó una prueba t-Student pareada, que comparó el consumo de agua y de almendra (Fig. 20). La diferencia fue estadísticamente significativa ($t_{(9)}=7.368$, $p<0.0001$). Indicando que los ratones pueden discriminar el componente olfativo del EC.

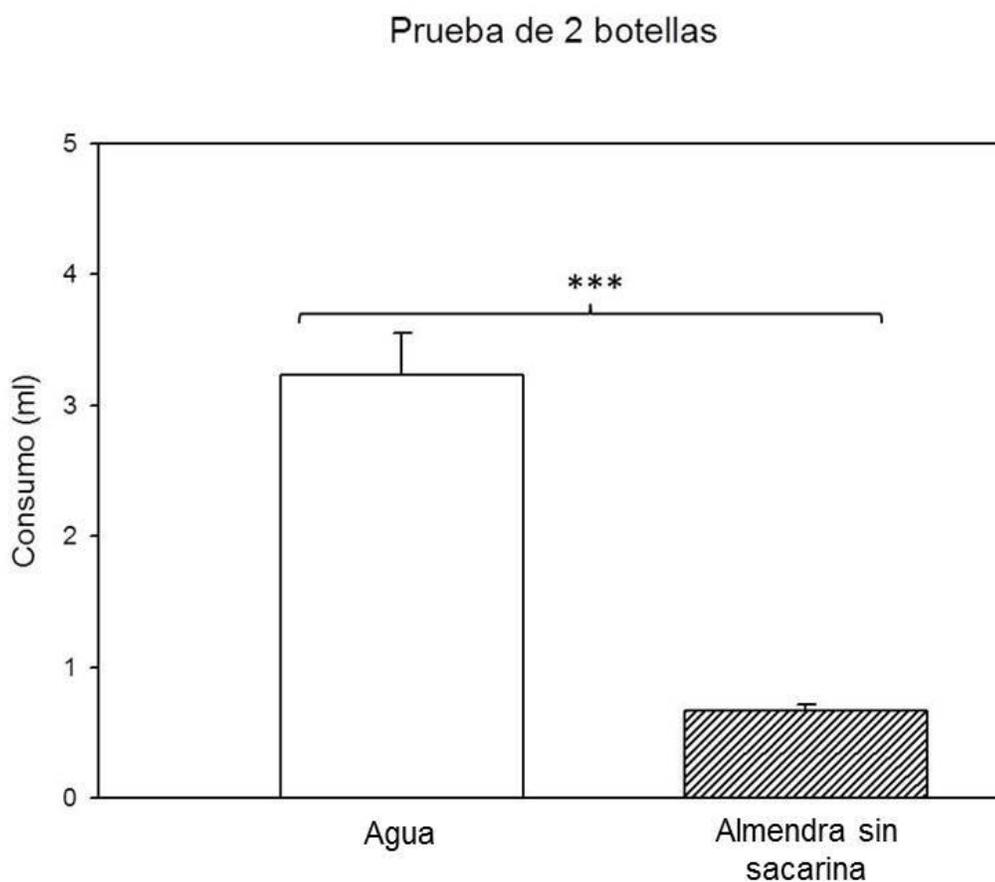


Fig. 20. Se encontró diferencia significativa en el consumo de agua contra el consumo de almendra, siendo éste muy escaso.

Sacarina vs almendra

Al comparar la ingesta de sacarina (consumo promedio de 1.32 ± 0.34 mml) contra almendra (consumo promedio de 0.95 ± 0.71) por medio de una prueba t-Student pareada no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

Experimento preliminar 4. Discriminación del olor y del sabor durante la prueba de 2 botellas.

Con el presente trabajo se logró evaluar la preponderancia que tiene cada modalidad sensorial, además de identificar la capacidad de memoria de los sujetos durante una prueba de discriminación.

Durante 4 días se entrenó a un grupo de ratones ($n=6$) de 8 meses de edad. Para establecer el CAPO, se utilizaron las mismas condiciones que en el experimento preliminar 3, es decir, se permitió el acceso durante 30 min a una solución de agua + sacarina (al 0.1%) + esencia de almendra (0.2ml de esencia marca Mc Cormick®), posteriormente, se inyectó LiCl (concentración de 25.4mg/kg) vía i.p. al 2% del peso corporal.

Se comparó el consumo del EC durante los 4 días de entrenamiento, por medio de un ANOVA de medidas repetidas se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3,5)}=22.41$, $p<0.0001$), un análisis *post hoc* de Tukey mostró que la diferencia en el consumo fue entre el día 1 con los días 2, 3 y 4 (Fig.21).

Entrenamiento

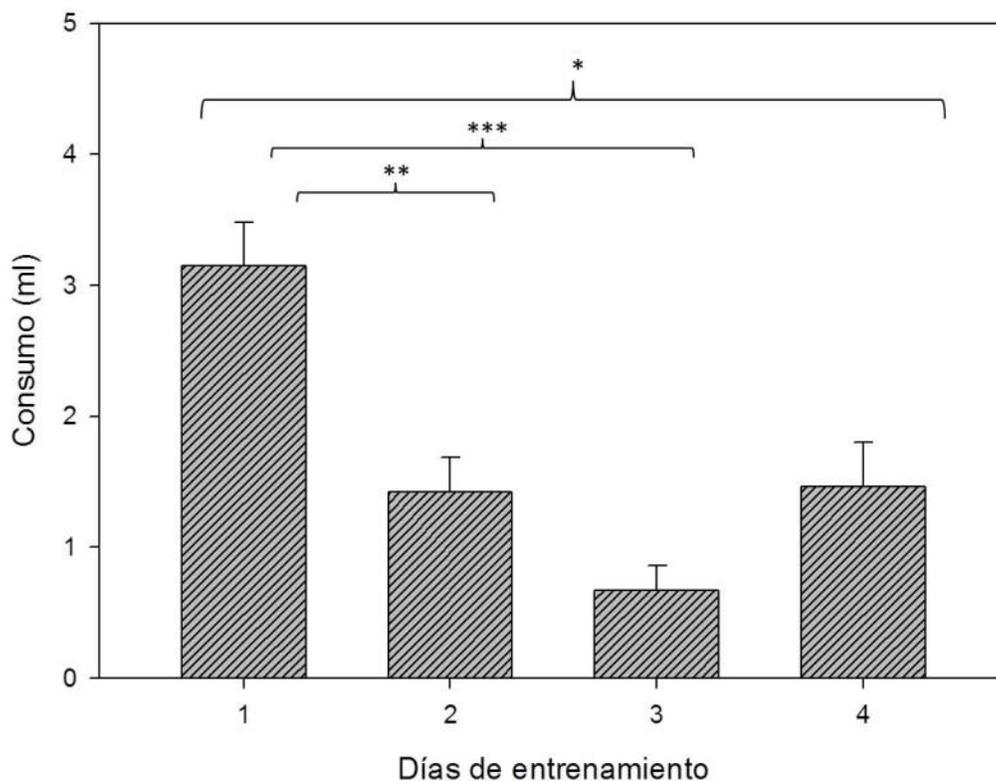


Fig. 21. Durante los 4 días de entrenamiento, los sujetos mostraron decremento en el consumo de la solución de sacarina + almendra que resultó ser estadísticamente significativa, al comparar el consumo que presentaron el día 1 con los días 2, 3 y 4.

Durante la prueba de 2 botellas, se permitió el acceso libre durante 30 min a 2 líquidos distintos. Se realizaron 3 pruebas diferentes, una por día. Las evaluaciones se describen en la tabla a continuación (Tabla 3):

Día	Botella 1	Botella 2
1	Agua	Sacarina + almendra
2	Agua	Almendra
3	Agua	Sacarina

Tabla 3. Evaluaciones de 2 botellas realizadas en el experimento preliminar 4.

Agua vs sacarina + almendra

Mediante el uso de una prueba t-Student pareada se observaron diferencias estadísticamente significativas ($t_{(5)}=4.279$, $p<0.01$), pues los sujetos consumieron más agua que solución de sacarina + almendra (Fig. 22)

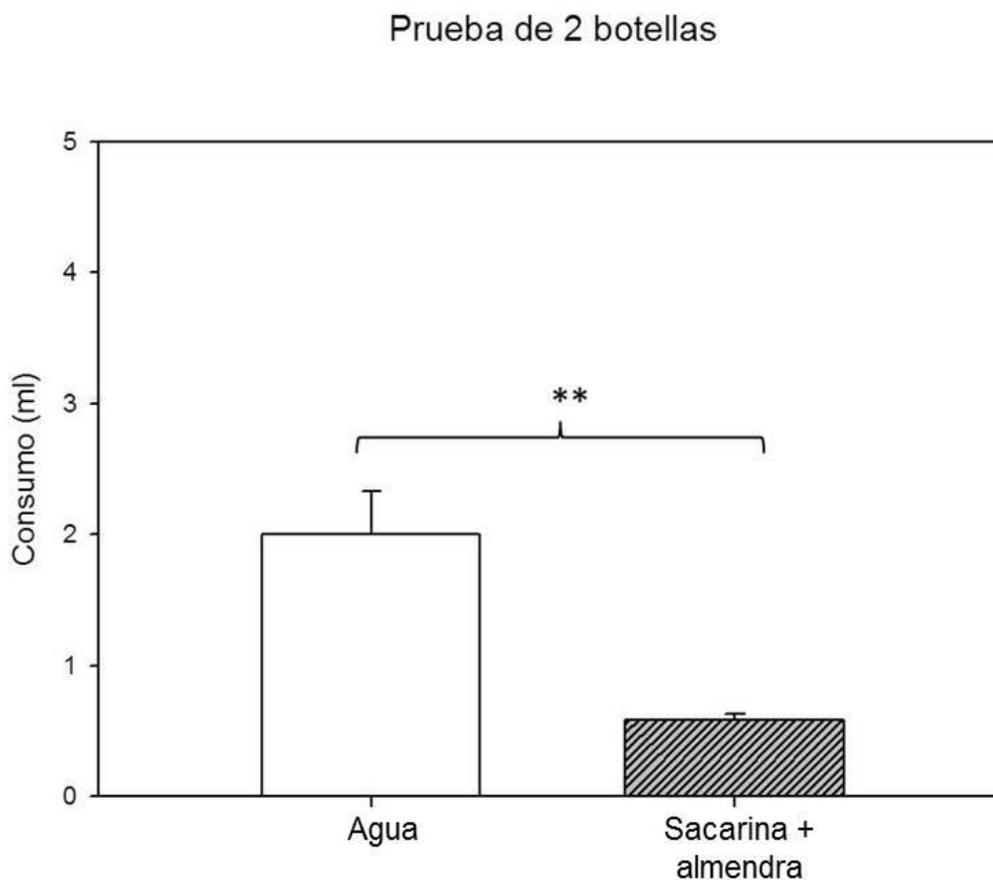


Fig. 22. Comparación entre el consumo de agua contra el consumo de sacarina+ almendra, se registró que los sujetos presentaron mayor consumo de agua que del otro líquido, dicha diferencia es significativa estadísticamente.

Agua vs almendra

La comparación entre el consumo de agua y el consumo de almendra se analizó por medio de una prueba t-Student pareada, la cual, resultó ser estadísticamente significativa ($t_{(5)}=5.676$, $p<0.01$), indicando que se consumió más agua que almendra (Fig. 23).

Prueba de 2 botellas

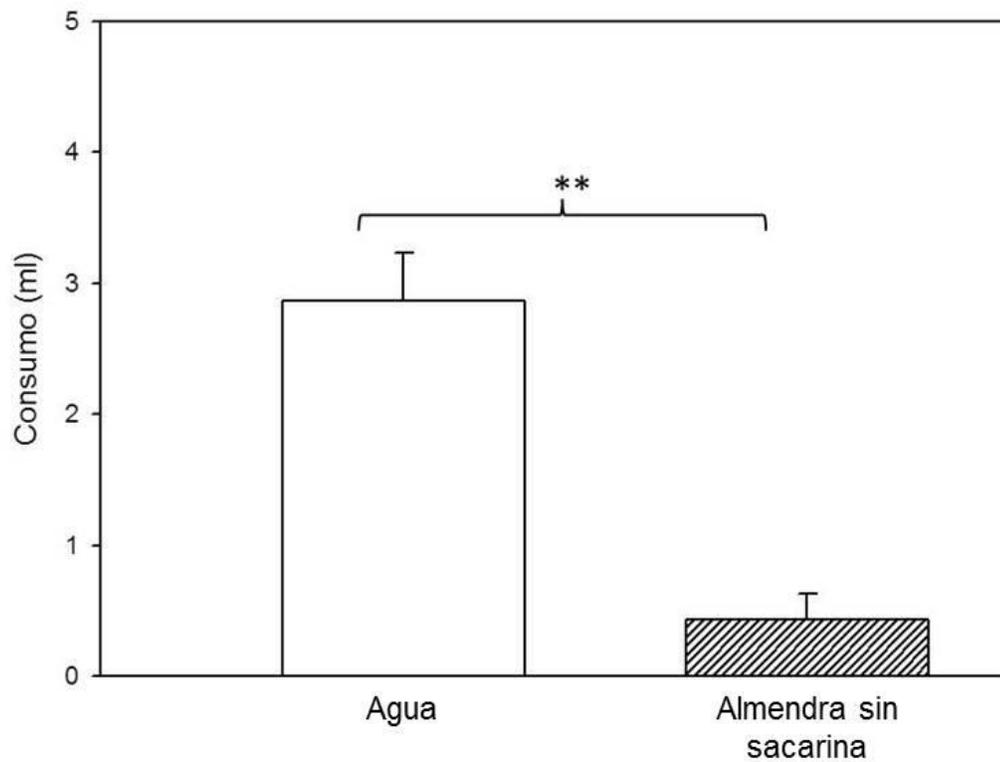


Fig. 23. Diferencia estadísticamente significativa, entre el consumo de agua comparado con el consumo de almendra.

Agua vs sacarina

Al comparar la cantidad de líquido ingerido se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($t_{(5)}=3.085$, $p<0.05$) al realizar una prueba t-Student pareada, indicando mayor consumo del agua (Fig.24).

Prueba de 2 botellas

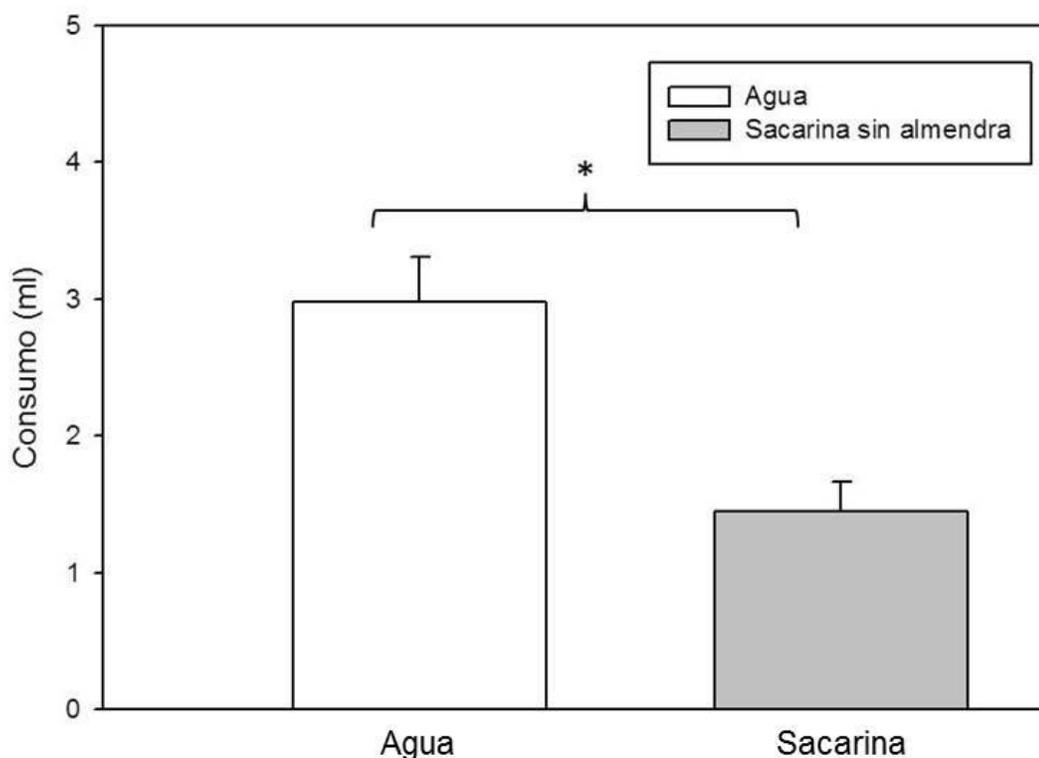


Fig. 24. Ingesta de agua comparada con ingesta de sacarina, durante una prueba de 2 botellas, la diferencia es estadísticamente significativa.

Discusión de los experimentos preliminares.

En el experimento preliminar 1, al efectuar la prueba de 2 botellas comparando el consumo de agua contra el consumo de sacarina, se identificó que en el grupo con la concentración de LiCl de 12.5mg/ml, la ingesta de agua fue mayor que la de sacarina, no obstante, no se observa diferencia estadística debido a que el consumo fue muy variable y se presenta un alto rango de error estándar de la media.

En el experimento preliminar 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de almendra y vainilla, sin embargo, el grupo almendra obtuvo una disminución en el consumo tanto en el segundo día de entrenamiento, como durante la prueba de 2 botellas. Sin embargo, es necesario que se busquen otro

tipo de esencias que puedan funcionar como estímulos olfativos para producir mayor saliencia del estímulo.

En el experimento preliminar 3, al efectuar la prueba de 2 botellas se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el consumo de agua con el consumo de sacarina + almendra, de igual forma, la diferencia fue significativa al comparar el consumo entre agua y solución de esencia de almendra; no obstante cuando se comparó la ingesta de agua contra sacarina no se encontró diferencia en el consumo; dicho aspecto podría interpretarse como que los sujetos no eran capaces de discriminar el componente gustativo del estímulo original (sacarina + almendra), pero probablemente, la preferencia por la sacarina se deba a la predilección de los roedores por consumir sustancias dulces, además pudo existir un fenómeno de habituación por el número de evaluaciones realizadas y la relación temporal con el último día que fueron sometidos al entrenamiento.

En el experimento preliminar 4 durante la prueba de 2 botellas, se registró una diferencia estadísticamente significativa en la ingesta de agua comparada con la de sacarina + almendra, esta diferencia se mantuvo aun cuando el EC (sacarina + almendra) se presentó por separado, es decir, agua contra almendra o agua contra sacarina, indicando que los sujetos aprendieron a identificar ambos componentes del estímulo (olor y sabor) como nocivos, aspecto que concuerda con los resultados obtenidos por Shionoya y Datiche (2009) donde los animales rechazan el sabor y el olor.

Conclusión de los experimentos preliminares

Los experimentos preliminares previamente descritos, permitieron identificar la concentración y dosis del LiCl (Pre. 1), la concentración de la sacarina y de la esencia de almendra (Pre. 2), así como de los días de entrenamiento (Pre. 3 y 4).

Así mismo, gracias a las distintas evaluaciones de 2 botellas efectuadas en los experimentos Pre. 3 y 4, se logró vislumbrar que los sujetos eran capaces de identificar los componentes del EC (olor y sabor) como nocivos, indicando que la

presentación de ambos era importante para la correcta discriminación de estímulos, pues el componente gustativo potenció la saliencia del estímulo olfativo.

Los resultados de los experimentos Pre. 3 lograron reproducirse satisfactoriamente en el experimento Pre. 4, demostrando que la edad de los sujetos no es un factor determinante para la adquisición ni ejecución del paradigma de CAPO.

Finalmente, los resultados obtenidos de esta serie de experimentos preliminares lograron utilizarse como plataforma para la realización del experimento que analizó el efecto de la isquemia cerebral aguda sobre el aprendizaje y la memoria asociativa.