



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# FACULTAD DE PSICOLOGÍA

EFFECTO DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO EN LAS  
ALTERACIONES DEL APRENDIZAJE Y MEMORIA  
INDUCIDAS POR ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA

# TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A

**DAVID OMAR HERNÁNDEZ AGUILAR**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Claudia Gómez Acevedo.**

**REVISORA DE TESIS:**

**Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez.**

**JURADO:**

**Dra. María Dolores Rodríguez Ortiz**

**Dr. Jaime Eduardo Calixto González.**

**Dra. Beatriz Gómez González.**



MÉXICO, D.F., CIUDAD UNIVERSITARIA, 2013.



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.

***“LA PSICOLOGÍA TIENE UN LARGO PASADO, PERO UNA HISTORIA BREVE” –  
HERMANN EBBINGHAUS***

***“NO ES EL MÁS FUERTE DE LAS ESPECIES EL QUE SOBREVIVE, TAMPOCO ES  
EL MÁS INTELIGENTE EL QUE SOBREVIVE. ES AQUEL QUE ES MÁS ADAPTABLE  
AL CAMBIO” – CHARLES ROBERT DARWIN***

***“LA CIENCIA SE COMPONE DE ERRORES, QUE A SU VEZ, SON LOS PASOS  
HACIA LA VERDAD” – JULIO VERNE***

***“HASTA LA PERSONA MÁS PEQUEÑA PUEDE CAMBIAR EL CURSO DEL  
FUTURO” – J.R.R. TOLKIEN***

## **¡GRACIAS!**

Primeramente, a mis padres Alicia Aguilar Urbina y David Hernández Morales les agradezco no solamente por darme la vida, sino también por impulsarme, encaminarme y apoyarme en cada uno de los aspectos de mi vida. Gracias por ser mis principales pilares, por creer en mí y por todo su cariño. A pesar de que a veces no estemos de acuerdo en todo, mamá y papá, sin ustedes yo no estaría donde me encuentro hoy en día, les estaré eternamente agradecido por estar siempre a mi lado y por todo su esfuerzo; es por ello que este trabajo se los dedico a ustedes, con todo mi cariño y respeto. Siempre serán lo más importante en mi vida y saben que los quiero mucho.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado una oportunidad hace 8 años de entrar a sus maravillosas instalaciones. Por consiguiente, le agradezco a la Escuela Nacional Preparatoria Plantel No. 2 “Erasmus Castellanos Quinto” y a la Facultad de Psicología por albergarme, prepararme y formarme durante estos años, en donde no sólo me llevo valiosos conocimientos y aprendizajes, también me llevo hermanos, grandes amigos y valiosos y hermosos recuerdos. De la misma manera le agradezco al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina por darme la oportunidad de terminar el último tramo de formación académica y por apoyarme en la realización de este trabajo de tesis. Gracias, mi querida Universidad, por darme una formación a nivel académico, profesional, social e ideológico. Por esta razón, este trabajo no sólo materializa toda la dedicación y esfuerzo que me brindaron durante este tiempo, también representa toda mi gratitud hacia mi máxima casa de estudios.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo, por darme una oportunidad dentro de su equipo de trabajo, por permitirme realizar mi servicio social y la presente tesis con ella. Gracias, Doctora, por confiar en mí y en mi trabajo, por apoyarme, guiarme, tenerme paciencia, regañarme cuando era necesario y echarme porras en todo momento. Aprecio todo lo que aprendí con usted y la inspiración para alentarme a seguir en la investigación

A mis mejores amigos, que más que amigos son hermanos para mí, gracias Enrique y Paulina por brindarme su amistad, cariño y confianza, por todos estos años de buenos momentos y alegrías, por todo lo que he aprendido de ustedes, gracias por estar ahí cuando los he necesitado, los quiero mucho. De la misma manera y no por ello menos importante, agradezco a mis demás hermanos y amigos, cada uno de ustedes ha marcado mi vida de manera diferente, pero igual de especial, siempre atesoraré su cariño, consejos y los buenos momentos que he pasado a su lado. Gracias Mayra Itzel, Sergio, Omar, Daniel, Octavio, Claudia Elizabeth, Mayra Gabriela, Jimena, Marcela, Tania, Nadia, Daniela, Guadalupe, Gaby, Diego, Sergio Diego, Ana Lilia, Ana Michelle, Laura, Carolina, Silvia, Mauricio, Miguel, Irving, Luis, Alejandro, Cecilia, Sandra, Juan José, Rebeca, Angélica, Pedro y Fabián Eduardo.

A mis abuelos, porque a pesar de que sólo me quedas tú abue Guadalupe, sin ustedes yo no formaría parte de esta hermosa familia a la que pertenezco. Gracias abue por cuidarme, quererme y recibirme con tanto cariño cada vez que te visito. Sé que donde quiera que se encuentren mis demás abuelos, ellos siempre cuidan de mi familia y de mí.

A mis tías, tíos, primas y primos que me han ayudado y cuidado durante todos estos años. Gracias por hacerme sentir parte de esta familia y por haber sido parte importante durante mi infancia, llena de buenos recuerdos.

A mis compañeros de laboratorio y ahora grandes amigos: Amy, Claudia, Lisbeth, Nuria y Luis Alejandro, gracias por el tiempo prestado durante las cirugías, experimentos, exposiciones, etc. Ha sido una gran experiencia de trabajo y me la he pasado muy bien con ustedes durante todo este tiempo, además de haber aprendido bastante de ustedes. También le estoy muy agradecido a Betty por ayudarme con los animales durante los experimentos y también por la ayuda brindada para tenerlos en buenas condiciones.

A cada uno de mis profesores: German Álvarez Díaz del León, Cesar Casasola Castro, Gerardo Ortiz Moncada, Florente López Rodríguez, Arturo Bouzas Riaño, José Fernando Peña Ortega, Azalea Reyes Aguilar, Olga Araceli Rojas Ramos, Irma Yolanda del Rio Portilla, Maura Jazmín Ramírez Flores, Margarita Lagarde Lozano, Selma González Serratos, Armando Nava Rivera, Hugo Fernández de Castro, Cecilia Verduzco Martínez, Laura Araceli Arias, Daniel Torres Pelayo, Salvador Espinoza Cruz, entre muchos más. Gracias queridos profesores, por su dedicación y paciencia para transmitirme sus conocimientos, los cuales atesoraré siempre. Sin ustedes no lo hubiera logrado, gracias por satisfacer mi curiosidad y mi hambre de conocimientos.

A mis sinodales: Dra. Martha Lilia Escobar, Dra. Beatriz Gómez, Dra. María Dolores Rodríguez Ortiz y Dr. Jaime Eduardo Calixto González, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus correcciones y anotaciones que sin duda enriquecieron y mejoraron este trabajo.

A cada una de las personas que me brindaron su atención y ayuda durante mi estancia en la Facultad de Medicina, gracias Dr. Rodolfo Rodríguez Carranza, Dr. Jacinto Santiago Mejía, Dra. Rosa Ventura Martínez, Dra. Leticia Parra Gámez, Dr. Víctor Torres Flores, Don Óscar, Don Ale, Jacqueline y Yadira.

A quien se me olvide mencionar, pero que también haya marcado mi vida de alguna forma. Y por último, mil gracias a los nobles seres que dieron su tiempo, espacio y vida para que yo hiciera mis experimentos. Aprendí mucho de ustedes.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
2.1. Isquemia cerebral aguda.....	13
2.1.1. Enfermedad Vascular Cerebral (EVC).....	13
2.1.2. Isquemia cerebral: Definición y clasificación.....	15
2.2. Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	17
2.2.1. Muerte neuronal por necrosis.....	17
2.2.2. Muerte neuronal por apoptosis.....	20
2.3. Anatomía vascular cerebral humana.....	21
2.3.1. Sistema carotideo.....	22
2.3.2. Sistema vertebrobasilar.....	22
2.3.3. Arterias cerebrales.....	23
2.4. Alteraciones clínicas inducidas por isquemia cerebral aguda.....	24
2.5. Modelos experimentales en animales con isquemia cerebral.....	25
2.6. Modelo de Sección Secuencial de las Arterias Carótidas Comunes (SSACC).....	27

2.6.1. Características del modelo de la sección secuencial de arterias carótidas comunes.....	27
2.6.2. Alteraciones conductuales producidas por SSACC.....	29
2.7. Estrategias experimentales para el estudio de aprendizaje y memoria.....	31
2.7.1. Laberinto Radial (RAM).....	35
2.7.2. Laberinto Acuático de Morris (MWS).....	36
2.7.3. Laberinto en Y o T.....	37
2.8. Modelo de laberinto acuático en Y.....	37
2.9. Neuroprotección.....	38
2.9.1. Fármacos neuroprotectores.....	38
2.9.2. Neuroprotección en la clínica.....	39
2.10. Modelos de ambientes enriquecidos.....	41
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>IV. MÉTODO.....</b>	<b>46</b>
4.1. Objetivos.....	46
4.1.1. Objetivo general.....	46
4.1.2. Objetivos específicos.....	46
4.2. Hipótesis.....	46
4.3. Variables bajo estudio.....	47
4.3.1. Determinación de variables.....	47

4.3.2. Definición operacional y conceptual de variables.....	47
4.4. Animales.....	48
4.5. Diseño experimental.....	48
4.6. Procedimiento quirúrgico.....	49
4.7. Criterios de Exclusión.....	50
4.8. Procedimiento experimental.....	50
4.9. Modelo de ambiente enriquecido.....	53
4.10. Laberinto en Y acuático.....	54
4.10. Análisis estadístico.....	55
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
5.1. Mortalidad.....	56
5.2. Latencia de nado.....	61
5.3. Errores de ejecución.....	66
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>80</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS.

EVC	Enfermedad Vascular Cerebral
SNC	Sistema Nervioso Central
TIA	Ataque Isquémico Transitorio
SSACC	Sección Secuencial de Arterias Carótidas
ml/min	Militro por minuto
s	Segundos
ATP	Adenosin Trifosfato
Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>	Bomba Sodio – Potasio
Ca <sup>2+</sup>	Ion de Calcio
pH	potencial de hidrógeno
tPA	activador tisular de plasminógeno
NMDA	Receptor Glutamatérgico Ionotrópico N-Metil-D-Aspartato
AMPA	Receptor $\alpha$ -Amino-3-Hidroxil-5-Metil-4-Isoxazol-Propionato
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
BAD-APAF	Complejo Citocromo C-Proteína Proapoptótica
EGG	Electroencefalograma
TAC	Tomografía Axial Computarizada
PET	Tomografía por Emisión de Positrones (por sus siglas en ingles)
RMF	Resonancia Magnética Funcional
RAM	Laberinto Radial (por sus siglas en ingles)
MWM	Laberinto Acuático de Morris (por sus siglas en ingles)
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
2OV	Modelo de Oclusión de 2 Brazos
4OV	Modelo de Oclusión de 4 Brazos

## RESUMEN

Las enfermedades vasculares cerebrales (EVC), son la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad en la población de adultos mayores, la modalidad que presenta mayor prevalencia es la isquemia cerebral. La cual se puede definir como una insuficiencia en el flujo sanguíneo que priva al tejido cerebral de oxígeno y glucosa, impidiendo, además, la eliminación de residuos provenientes del metabolismo celular. Actualmente sólo existe un fármaco con uso clínico para el tratamiento de la isquemia cerebral, al cual no pueden acceder todos los pacientes. Aquí radica la importancia del estudio de alternativas terapéuticas con efecto neuroprotector que, ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes post EVC.

Existe evidencia de que los modelos de ambiente enriquecido inducen mejorías sensoriales, cognitivas y motores en la recuperación de los animales experimentales que sufren de una afectación al SNC. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar el potencial efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en las alteraciones del aprendizaje y la memoria, inducidas por isquemia cerebral aguda. Para ello se utilizó una prueba de laberinto acuático en Y, el cual es utilizado para evaluar memoria espacial en animales experimentales. Se cuantificaron los parámetros de latencia y promedio de errores en la prueba conductual con este laberinto.

Para la realización del presente trabajo, se usaron ratones macho envejecidos (8 – 12 meses) de la cepa CFW Taconic, los cuales se dividieron en seis grupos, en función de las dos variables independientes: el ambiente enriquecido (presencia y ausencia) y la condición experimental (SSACC, sham y control). El experimento se estructuró en tres fases: adquisición, línea base y recuperación (24, 48 y 72 horas); las cuales se efectuaron antes y después de la primera y segunda cirugía. El reforzador siempre fue una plataforma en el brazo izquierdo del laberinto. Los animales fueron sometidos a la cirugía de sección secuencial de arterias carótidas comunes (SSACC), con un intervalo de 32 días entre cortes. Los animales expuestos al ambiente enriquecido se colocaron en cajas-habitación especiales (de 25cm x 15cm x 55cm), después de la primera cirugía y hasta el final de los experimentos.

Después de la primera cirugía los grupos muestran una disminución en los promedios de sus latencias de nado y errores, sin encontrarse cambios significativos entre ellos. Los animales isquémicos expuestos al ambiente enriquecido presentaron un aumento en su actividad espontánea después de ser colocados en las cajas-habitación especiales durante el primer día. Tras efectuarse la segunda cirugía los animales que fueron sometidos a la isquemia cerebral presentaron alteraciones conductuales caracterizadas en otros estudios, siendo las alteraciones motoras en la conducta de nado las más importantes para el estudio. Se excluyeron del análisis final a los animales cuyas alteraciones motoras les imposibilitara acabar la tarea de laberinto. Se observó un aumento en los promedios de la latencia de nado y el promedio de errores en los grupos isquémicos a las 24 horas postcirugía. Los animales sometidos al ambiente enriquecido mostraron una disminución en el número de errores a las 48 y 72 horas después de la segunda cirugía, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos isquémicos que nos permita ver un efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en las alteraciones del aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático en Y, provocadas por isquemia cerebral en el modelo SSACC.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades vasculares cerebrales (EVC) son un proceso de instalación súbita, que constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, además son la principal causa de incapacidad y la tercera causa de muerte en los países industrializados, encontrándose entre los trastornos neurológicos más graves y más frecuentes. El cerebro humano representa el 2% del peso corporal (aproximadamente 1400 g), pero recibe el 15% del gasto cardiaco, traduciéndose en 800 ml/min. De esta cantidad, 350 ml/min fluyen por cada arteria carótida y de 100 a 200 ml/min lo hacen por el sistema cerebrobasilar. Por lo tanto, el cerebro consume alrededor del 20% del oxígeno utilizado por el organismo. El correcto flujo sanguíneo debe proveer un aporte constante de oxígeno, glucosa y otros nutrientes; además de remover dióxido de carbono, ácido láctico y otros productos metabólicos de desecho. Cuando esto no ocurre se presenta una EVC (Kandel, Schwartz y Jessell, 2000; Scremin, 2004, Alcalá-Ramírez y González-Guzmán, 2007).

Desde el punto de vista epidemiológico, las EVC representan un importante gasto sanitario debido a los costos que genera su tratamiento. Su incidencia al igual que otras enfermedades como los tumores cancerígenos y la diabetes, aumenta con la edad, afectando al 50% de la población mayor de 60 años, por lo tanto se consideran una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en adultos mayores (INEGI, 2009, 2010). En 2009 se reportó que en México 1 de cada 10 habitantes tiene 60 años o más, con ello se estima que para el 2050 existirán en el país 32.4 millones de adultos mayores en riesgo de desarrollar una EVC (lo que representa el 25% de la población total). Por ello, es esencial que los sistemas de salud mejoren sus campañas preventivas, tomando en cuenta las nuevas escalas poblacionales del país (Secretaría de Salud, 2001, INEGI, 2010).

Es posible observar en los sobrevivientes de una EVC una serie de manifestaciones clínicas, de éstas las alteraciones en las funciones motoras del organismo son el principal objetivo de las rehabilitaciones post EVC; sin embargo, en los últimos años las investigaciones experimentales se ha enfocado en los déficits

cognitivos y emocionales, para contribuir en la mejoría de la calidad de vida de los pacientes (Alejo-Martínez, 2011).

En este sentido, existen diferentes síndromes cognitivos que pueden clasificarse de acuerdo a los efectos que tienen sobre la memoria, de la siguiente manera: a) daño en áreas límbicas, causando primordialmente pérdida de la memoria declarativa, b) daños en el diencefalo (incluyendo tálamo), lo que produce déficits en la memoria procedimental y c) daño en el cerebro anterior, produciendo una pérdida más general de la función cognitiva. En términos matemáticos, cualquier déficit cognitivo después de una EVC tiene una correlación baja o alta con la recuperación a largo plazo (Hunter, Mackay y Rogers, 1998, Secretaria de Salud, 2001, Reynolds, Lane y Richards, 2010).

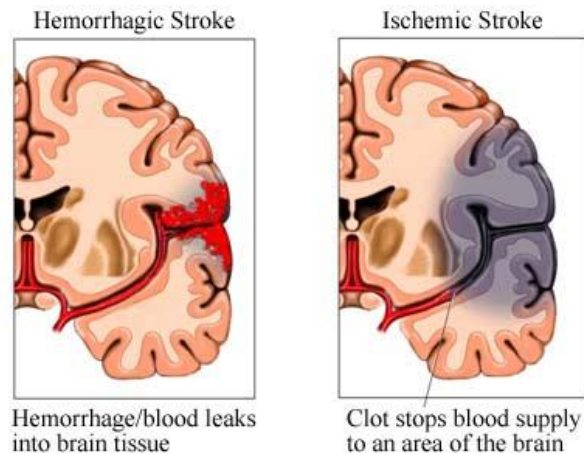
Existen pocos fármacos probados como agentes neuroprotectores, solo el fármaco activador tisular del plasminógeno (tPA) ha sido llevado a la clínica (Perez y Biller, 2002). Sin embargo, los resultados no son contundentes y pocos pacientes pueden tener acceso a este fármaco. Por ello es necesario encontrar alternativas terapéuticas neuroprotectoras que ayuden a los pacientes en su recuperación. En este contexto, los ambientes enriquecidos han sido utilizados durante muchos años en modelos animales para estudiar los efectos de la rehabilitación sobre la actividad sensorial, cognitiva y motora, después de alguna afectación al SNC. Estos estudios a su vez, son comparados con los principios de tratamientos de integración sensorial y rehabilitación neuronal con pacientes. Por todo esto, consideramos importante evaluar los efectos neuroprotectores de la exposición a los ambientes enriquecidos en modelos de isquemia cerebral para identificar su posible impacto en la actividad motora y cognitiva de los animales sometidos a la isquemia cerebral aguda y eventualmente su potencial uso en pacientes afectados por EVC.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Isquemia Cerebral Aguda.

#### 2.1.1. Enfermedad Vascular Cerebral (EVC).

La enfermedad vascular cerebral (EVC) se refiere a alteraciones en la irrigación sanguínea del cerebro, son procesos de instalación súbita y constituyen el tipo más común de trastornos del sistema nervioso central. Se caracteriza por el rápido desarrollo de signos neurológicos focales, que persisten por más de 24h, sin otra causa aparente que el origen vascular (Arauz y Ruíz-Franco, 2012). Estos trastornos adoptan dos modalidades básicas: EVC isquémico y EVC hemorrágico (Fig. 1).



**Fig. 1.** Dos principales tipos de AVC

Las EVC de tipo isquémico se caracterizan por la oclusión de un vaso sanguíneo, puede tener manifestaciones transitorias o permanentes y provocar un daño neuronal irreversible. Las EVC isquémicas suelen dividirse en 2 categorías: ataque isquémico transitorio (AIT) e infarto cerebral (IC). En un ataque isquémico transitorio no existe un daño neurológico permanente, para detectarlo se ha establecido un tiempo de duración de síntomas no mayor a los 60 minutos, una recuperación espontánea y no deben encontrarse evidencias de alguna lesión. Estudios recientes demuestran que, los pacientes que ha sufrido un AIT corren el riesgo de desarrollar un infarto cerebral semanas posteriores a la lesión.

Los infartos cerebrales pueden subdividirse en relación con dos parámetros: a) la posición anatómica de la lesión, que puede ser por oclusión de la circulación anterior (carotídea) o la circulación posterior (vertebrobasilar) y; b) de acuerdo al mecanismo que produce la oclusión, que puede deberse a un trombo, que es un coágulo de sangre en el interior de un vaso sanguíneo por un embolo, que es una obstrucción de los vasos por causa de objetos extraños como placas de colesterol. (Arauz y Ruíz-Franco, 2012).

Por su parte las EVC de tipo hemorrágico se caracterizan por la ruptura de un vaso sanguíneo, dando lugar a una colección hemática en el encéfalo. Las EVC de tipo hemorrágico pueden originarse por: a) aneurisma, que es provocado por el debilitamiento de las paredes de un vaso sanguíneo, formando una pequeña burbuja en el vaso, y b) alteración arteriovenosa, que es una conexión anormal entre las arterias y las venas, que puede provocar una ruptura y daño del vaso sanguíneo (Arauz y Ruíz-Franco, 2012). Se pueden encontrar 4 diferentes tipos de EVC hemorrágicos a) colección hemática dentro del parénquima encefálico, su localización más frecuente es a nivel de los ganglios basales, aunque también puede presentarse a nivel globular y en tronco encefálico; b) sangre en el espacio subaracnoideo del cerebro; c) colección hemática entre la duramadre y la tabla interna del cráneo; y d) sangre contenida entre la aracnoides y la duramadre (Leciñiana, 2006).

Debido a la alta prevalencia de las EVC, los investigadores han mostrado interés por catalogar los factores y poblaciones de riesgo. Dentro de los factores de riesgo podemos encontrar dos tipos: modificables y no modificables (Alcalá y González, 2007). Los factores no modificables son aquellos que están predeterminados y no podemos cambiar, entre ellos encontramos la edad, el sexo, la historia familiar y la raza. La población mayor a 60 años corre más riesgo de desarrollar una EVC, que la población más joven; por otro lado, los hombres están más expuestos a sufrir una EVC que las mujeres (con 1.25 más de probabilidades), sin embargo, encontramos más casos de EVC en mujeres que en hombres, debido a que ellas tienen un periodo de vida más prolongado. Una persona cuya historia familiar tiene le da una predisposición heredada a factores de riesgo (como la hipertensión o diabetes), tiene altas probabilidades de presentar una EVC. En cuestiones de raza, los afroamericanos

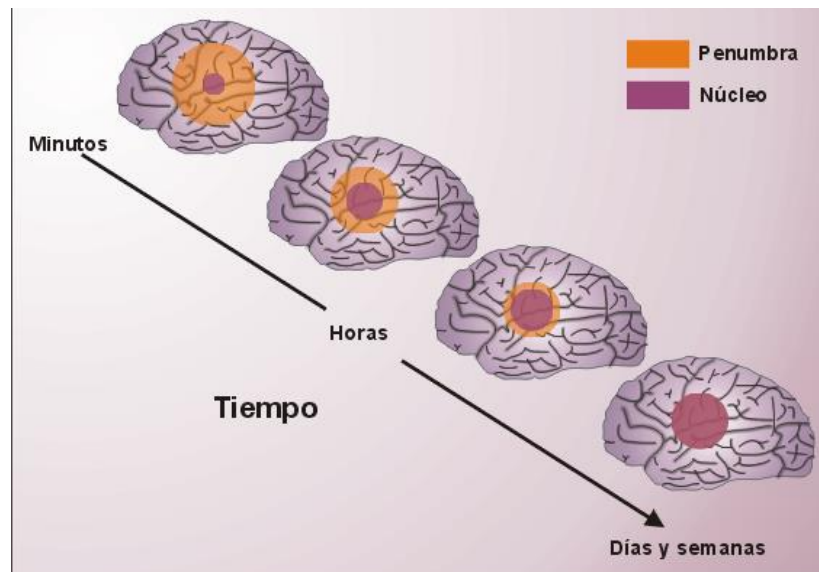
presentan altas tasas de prevalencia en desarrollar EVC, en comparación con otras razas (Delgado – García, 2009; Alcalá y González, 2007; Sacco, 2002; Pebet, 2002). Por su parte, dentro de los factores modificables encontramos un conjunto de alteraciones predisponentes que, se originan varios años antes de que se presente una EVC. La mayoría de estos factores son enfermedades y estilos de vida que pueden desencadenar EVC, como el sedentarismo, tabaquismo, alcoholismo, abuso de drogas, obesidad y diabetes melitus tipo II (Sacco, 2002). La hipertensión arterial sistémica es el principal factor modificable, por ejemplo, en México 15 millones de personas sufren de esta enfermedad y el 61% ignoran que la padecen (Gaceta UNAM, 2008).

### 2.1.2. Isquemia Cerebral: Definición y Clasificación.

La isquemia cerebral es definida como la insuficiencia del flujo sanguíneo cerebral, reduciéndose por debajo de 30 ml/min, lo cual no solo priva de oxígeno, glucosa y nutrientes al organismo, sino también impide la eliminación de residuos del metabolismo celular que tienen un potencial tóxico. La mayoría de las EVC son de tipo isquémico, registrándose en el 80% de los casos (Rosamond et al, 2007). Cuando una isquemia es grave y duradera, las neuronas y otros elementos celulares mueren, a esto se le ha denominado infarto. La isquemia se torna grave en el denominado foco o núcleo isquémico, en este sitio en donde a muerte neuronal se da casi de manera inmediata, mientras que en su periferia se establece un anillo denominado área de penumbra, en el cual la disminución del flujo es menos grave, gracias a los aportes sanguíneos de las arteriales colaterales del tejido adyacente no isquémico (como muestra la Fig. 2). En esta zona, el periodo de tiempo durante el cual el fenómeno isquémico persiste representa una ventana de tiempo potencialmente viable para la recuperación del tejido (Back, 1998, citado en Arango-Dávila, Escobar-Bentancourt, Cardona-Gómez y Pimienta-Jiménez, 2004). Sin embargo, la viabilidad de recuperación de las células en la zona de penumbra tiene un tiempo limitado ya que la disminución en las reservas de oxígeno y glucosa puede desencadenar diversos



procesos patológicos que pueden conducir a la muerte celular de las neuronas localizadas en la zona de penumbra (Hossmann, 2006).

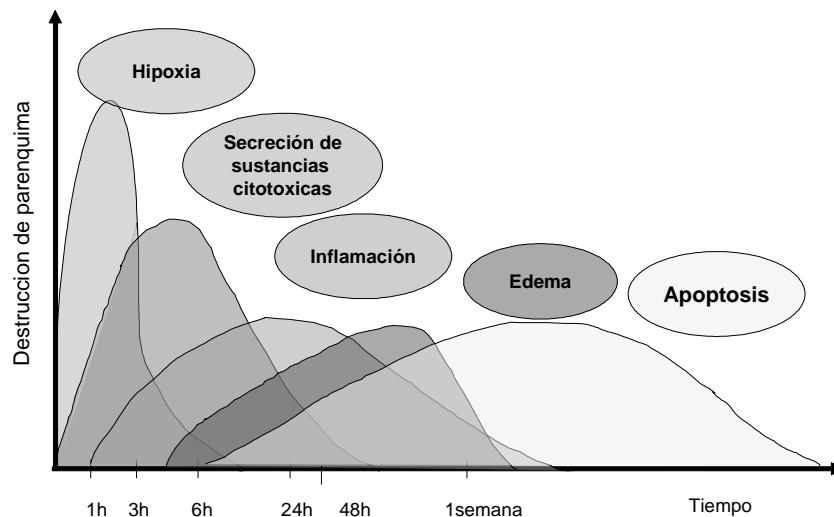


**Fig. 2.** Foco isquémico (o núcleo) y zona de penumbra. Su evolución a través del tiempo, el área de penumbra va reduciéndose hasta desaparecer y convertirse en zona de lesión (tomado y modificado de Dirnalg et al., 1999).

La isquemia cerebral de acuerdo a su localización puede clasificarse en focal o global. La isquemia cerebral de tipo focal puede ser permanente o transitoria, ocurre cuando la oclusión arterial se localiza en una región determinada, provocando una inmediata interrupción del flujo sanguíneo, pero se mantiene cierto nivel de irrigación colateral, que podría favorecer la reversibilidad del daño neuronal y por ende la supervivencia neuronal (Back, Hemmen, y Schüler, 2004; Endres y Dirnagl, 2002). Por su parte la isquemia global está asociada a la pérdida del flujo cerebral colateral, que es el resultado de condiciones clínicas como infartos cardiacos o bypass coronales, provocado por el bloqueo de las arterias carótidas. Aun cuando se presente en periodos breves de tiempo se produce un daño celular irreversible, solo del 10 al 20% de los pacientes con infarto cardiaco global muestran una recuperación favorable, los demás mueren o quedan en un estado vegetativo. Los pacientes que logran recuperarse muestran una amplia variedad de déficits cognitivos, motores y neurológicos (Petito, Feldmann, Pulsinelli, y Plum, 1987; Sharma, S. S. y Gupta, 2007).

## 2.2. Fisiopatología de la Isquemia Cerebral.

La isquemia cerebral desencadena una serie de fenómenos moleculares a corto y largo plazo (Fig. 3), los cuales tienen su punto de inicio con el fracaso energético relacionados con la interrupción de la fosforilación oxidativa, la cual desencadena la sobre activación de los receptores de glutamato, la acumulación intracelular de iones de calcio, el reclutamiento de células inflamatorias, el aumento de radicales libres y procesos patológicos de apoptosis (Arango-Ávila et. al., 2004; Cheng, Al-Khoury y Zivin, 2004). En la isquemia cerebral la privación de los sustratos metabólicos, desencadena mecanismos de muerte neuronal, conocidos como necrosis y apoptosis, los cuales causan un aplanamiento eléctrico en el EEG, además de cambios en el flujo sanguíneo regional. Ambos procesos, están íntimamente relacionados; se ha demostrado que en una misma región algunas células mueren por necrosis, otras por apoptosis y otras por una combinación de ambas (Murphy y Corbett, 2009; Leciña, 2006; Guevara, Rodríguez, Álvarez, Riaño y Rodríguez, 2004).



**Fig. 3.** Evolución de los signos clínicos y patológicos de la isquemia cerebral en el tiempo.

### 2.2.1. Muerte neuronal por necrosis.

También denominada oncosis o necrofanerosis, es el resultado del fracaso energético agudo, que desencadena lisis de la membrana y procesos inflamatorios (Arango-Dávila

et al., 2004). La muerte neuronal por necrosis es un fenómeno pasivo que depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de enzimas líticas constitutivas, que eventualmente destruyen los componentes celulares (véase Fig. 4).

### *Acidosis láctica*

En los primeros estadios de la isquemia, el déficit de oxígeno desvía el metabolismo de la glucosa por vía anaerobia, ocasionando un aumento de ácido láctico, que a su vez induce la reducción del pH intra y extracelular. La cantidad de ácido láctico depende de la cantidad de depósitos tisulares de glucosa y glucógeno en el momento de presentarse la isquemia (Castillo, 2000; Doyle, Simon y Stenzel-Poore, 2008). Tras esta alteración se produce una hiperglucemia persistente que genera una excesiva acidosis capaz de agravar el daño cerebral, (Castillo, 2000; Guevara et al., 2004).

### *Crisis Energética*

La acidosis inhibe la fosforilación oxidativa, contribuyendo a la crisis energética. Al inhibirse la síntesis de ATP mitocondrial, el ATP restante en la célula es consumido durante los primeros dos minutos posteriores a la isquemia, ocasionando fallos en las bombas de sodio-potasio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) (Doyle, et al., 2008). Esta bomba consume alrededor del 70% de la energía celular; mantiene altas las concentraciones intracelulares de  $\text{K}^+$  y bajas concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$ , las cuales son necesarias para la propagación de los potenciales de acción. Durante la cascada isquémica y para ahorrar energía, el cerebro disminuye su actividad eléctrica gracias a la salida de  $\text{K}^+$  intracelular, que da como resultado la hiperpolarización transitoria de la membrana. Después de 5 minutos se alcanza un decremento de ATP del 90%, que es consecuencia la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y ATPasa de la membrana plasmática (Castillo, 2003; Doyle et al., 2008). Posteriormente ocurre un incremento intracelular de  $\text{Na}^+$  y el decremento de  $\text{K}^+$  dentro de la célula, causando una despolarización anóxica (Onténiente, Rasika, Benchoua, y Guéran, 2003) y, se abren

los canales presinápticos de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sensibles al voltaje, que aumentan la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Castillo, 2000; Castillo et al., 2003).

### *Excitotoxicidad*

La excitotoxicidad es provocada por la excesiva liberación de glutamato y las alteraciones en la recaptura del mismo (Castillo, 2000, Doyle et al., 2008). El aumento en la concentración extracelular de glutamato estimula a los receptores NMDA, los cuales abren sus canales y elevan los niveles de calcio dentro de la célula. (Castillo et al., 2003). La liberación de calcio intracelular puede causar la muerte celular aguda por necrosis y a su vez dar paso a eventos moleculares que provocan la apoptosis (Dirnagl, Ladecola, y Moskowitz, 1999). El  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como segundo y tercer mensajero universal capaz de desencadenar la inducción de múltiples cascadas citoplasmáticas y nucleares que a su vez, activa una serie de enzimas capaces de degradar el citoesqueleto, proteínas estructurales, membranas y otros organelos. Entre las enzimas desencadenadas se encuentran: proteasas, fosfolipasas, endonucleasas, proteinofosfatasas y sintetasas del óxido nítrico (Castillo, 2000). En suma, el resultado final es irreversible, deteriorando las membranas, los sistemas de neurotransmisores, las mitocondrias, además inhibe la síntesis de proteínas (Hazell, 2007).

### *Producción de Radicales Libres*

Un radical libre (ROS) es una especie reactiva del oxígeno, que es capaz de existir independientemente como un átomo al contener uno o mas electrones no pareados en su órbita más extrema (Hailliwel y Gutteridge, 2007). En condiciones normales, los radicales libres están presentes en los organismos manteniéndose en niveles adecuados por medio de mecanismos antioxidantes, sin embargo durante el evento isquémico se genera una cantidad excesiva de ROS, como consecuencia al daño mitocondrial provocado por la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Castillo, 2000). Los ROS pueden producir lipoperoxidación en las membranas plasmáticas y en los organelos intracelulares (Hossmann, 2006); la reacción con el óxido nítrico favorece la formación de peroxinitrito que causa reacciones químicas violentas como la fragmentación del ADN, la pérdida del citoesqueleto y la inhibición de transportadores de glutamato. Igualmente

tras la liberación de ROS ocurre estrés en el retículo endoplasmático, que puede llevar a la apoptosis (Arango-Davila et al., 2004; Hossmann, 2006).

### *Inflamación*

La inflamación ocurre horas o días posteriores al inicio de la isquemia con infiltración de leucocitos, neutrófilos y macrófagos; lo que puede provocar la progresión del daño isquémico debido a la generación de radicales libres en el tejido reperfundido o críticamente reperfundido (Hossmann, 2006; Leciña, 2006; Doyle et al., 2008).

#### 2.2.2. Muerte neuronal por apoptosis.

Denominada muerte celular programada, ocurre cuando se presenta una activación de mecanismos intracelulares dependientes de energía, que llevan a cabo la degradación regulada de una célula a través de enzimas efectoras, al final la célula degradada es eliminada por células fagocíticas, sin desencadenar reacción inflamatoria, véase Fig. 4 (Arango-Ávila et al., 2004). La apoptosis es iniciada por la expresión de genes que se activan por agentes nocivos externos o estímulos intracelulares (Hengartner, 2000; Yuan y Yankner 2000; Leciñana, 2006). Entre las enzimas más comunes que se activan durante la apoptosis encontramos a las caspasas efectoras, principalmente la Caspasa 3, que se encargan de destruir proteínas citoplásmicas, al modificar la homeostasis celular, estas proteínas destruidas son vitales para la célula, pues pueden encargarse tanto para la reparación de ácido desoxirribonucleico, como ser parte de la estructura del citoesqueleto (Hengartner, 2000; Yuan y Yankner 2000; Arango-Dávila et. al., 2004). Las Caspasas se activan cuando el citocromo c (que es liberado por la mitocondria) y el calcio intramitocondrial se unen para formar el complejo citocromo c-proteína proapoptótica BAD-APAF (Dirmagl et al., 1999; Doyle et al., 2008).

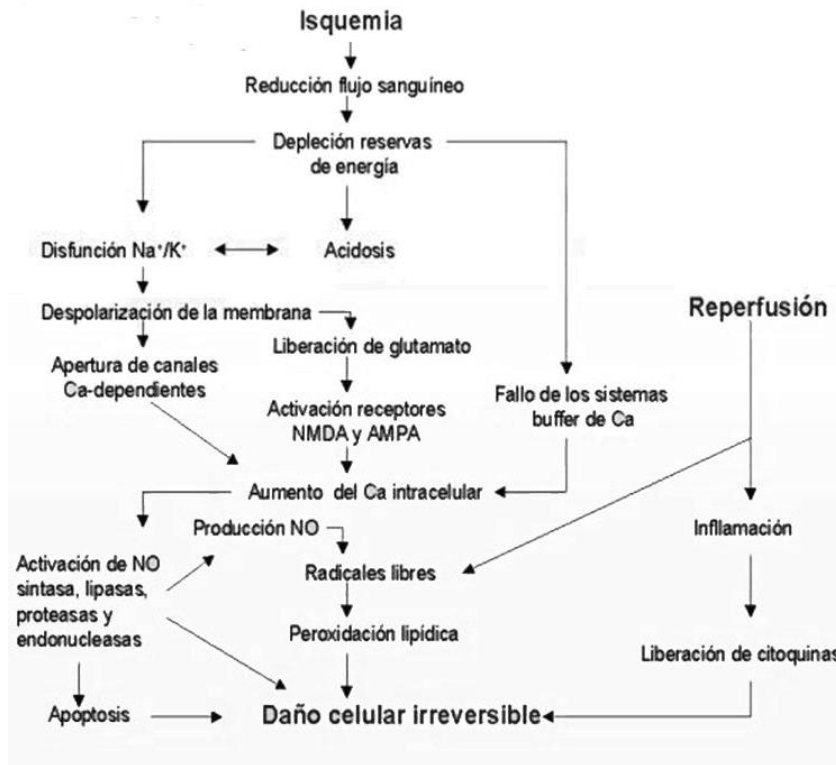


Fig. 4. Cascada de eventos que se producen durante la isquemia cerebral.

### 2.3. Anatomía vascular cerebral.

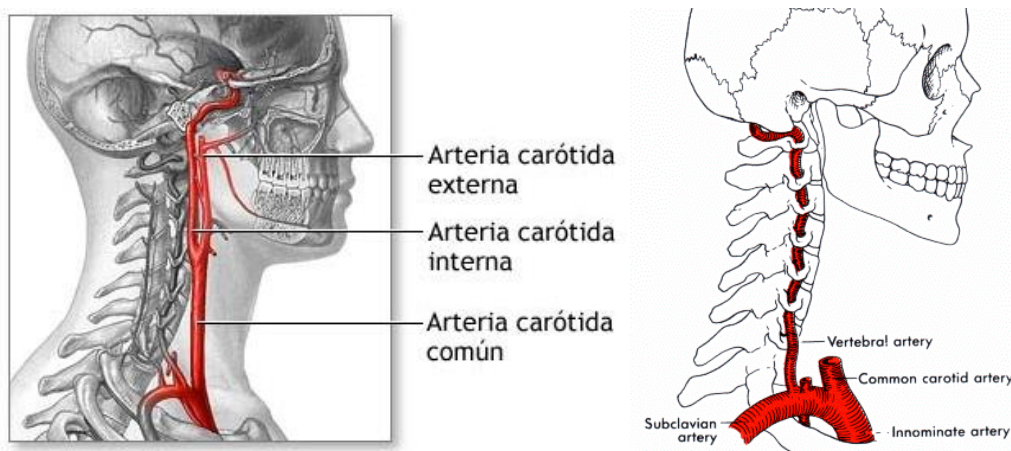
La irrigación sanguínea cerebral depende de dos sistemas de circulación de arterias sistémicas: el sistema circulatorio anterior o carotideo, el cual es alimentado por las carótidas internas, y el sistema circulatorio posterior o vertebrobasilar, que recibe sangre de las arterias vertebrales; en la cara inferior del cerebro, ambos sistemas se unen formando el polígono de Willis. En caso de presentarse alguna falla en la irrigación sanguínea, la interconexión es importante, pues funciona como un sistema compensatorio a través del polígono de Willis, en donde puede haber circulación colateral que rescata la región comprometida que es privada del flujo sanguíneo. Existe un alto porcentaje de ocurrencia de un evento isquémico en el sistema carotídeo (80-85 %), en donde los efectos neurológicos dependerán del área afectada, la severidad y duración del déficit sanguíneo, además de la capacidad de procesos plásticos reparadores (Futtrell y Millikan, 1996; Kandel et. Al., 2000; Alejo-Martínez, 2011).

### 2.3.1. Sistema carotídeo.

Formado por las arterias carótidas internas cuyas ramas principales son la arteria oftálmica, la arteria comunicante anterior, arterias cerebrales medias, la arteria coroidal anterior y la arteria ipsilateral (Fig. 5). Estas arterias se encargan de irrigar los hemisferios cerebrales (lóbulos frontal, parietal, y parte del lóbulo temporal), el diencefalo por las arterias oftálmicas, ganglios basales, capsula interna, nervios ópticos y la retina. Si ocurre una obstrucción en este sitio. el paso sanguíneo a los hemisferios puede afectarse considerablemente, destacando hemiplejia severa y hemi anestesia (Martin, 1989; Futrell y Millikan, 1996; Kandel et. al., 2000; Alejo-Martínez, 2011).

### 2.3.2. Sistema vertebrobasilar.

Este sistema está constituido por la arteria vertebral y basilar (Fig. 5), cuyas ramas se dividen en tres grupos: 1) ramas paramedianas (arteria espinal anterior), que irrigan estructuras de la línea media; 2) ramas circunferenciales cortas, que irrigan estructuras más laterales como pedúnculos cerebelosos inferiores, medios y superiores y 3) ramas circunferenciales largas como las arterias cerebelosas inferoposterior, inferoanterior, media y superior, también irriga estructuras laterales del tronco del encéfalo, pedúnculos cerebelosos, cerebelo y lóbulos temporal y occipital (Martin, 1989; Futrell y Millikan, 1996; Kandel et. al., 2000; Alejo-Martínez, 2011).



**Fig. 5.** Sistemas Carotideo y Vertebrobasilar.

### 2.3.3. Arterias cerebrales.

Se distribuyen a lo largo de todo el encéfalo, componiéndose de tres principales ramas: arteria cerebral media, arteria anterior y arteria posterior (Fig. 6). Las arterias por cada hemisferio forman el Polígono de Willis (Ostrosky-Solís y Ardila, 1991).

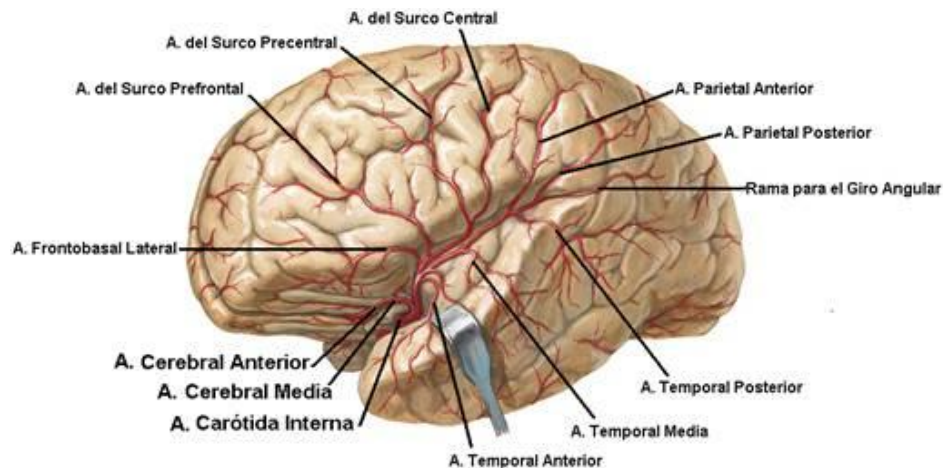


Fig. 6. Encéfalo y arterias cerebrales.

La arteria cerebral media es la arteria más grande, irriga toda la superficie lateral de cada hemisferio, excepto parte del lóbulo frontal y occipital. También denominada arteria peri Silvana. La arteria cerebral media presenta ramas corticales (orbitarias, frontales, parietales y temporales) y centrales (estriadas). Es uno de los territorios donde existe mayor frecuencia de ECV. La arteria cerebral anterior se encarga de irrigar parte del lóbulo frontal por sus ramas centrales, además colabora con la circulación de los núcleos lenticular, caudado y la cápsula interna; esto a través de las ramas corticales (orbitarias), frontales (parietales), coroidales y centrales. Estas arterias están conectadas en ambos hemisferios por la arteria comunicante anterior, que es considerada la región más afectada por aneurismas intracraneales. La arteria cerebral posterior se encarga de irrigar zonas mediales e inferiores del lóbulo temporal, el lóbulo occipital, el hipotálamo posterior y áreas receptoras visuales. Se originan en la bifurcación del tronco basilar y se ramifican de la siguiente manera: ramas corticales para las regiones temporal y occipital; arteria coroidea posterior; pedículo retro mamar y arteria cuadrigémina (Ostrosky-Solís y Ardila, 1991).



#### 2.4. Alteraciones clínicas inducidas por isquemia cerebral.

En general, en el proceso de isquemia cerebral los pacientes con un EVC pueden presentar una amplia variedad de alteraciones sensoriales, motoras y cognitivas. Estas manifestaciones clínicas dependen de la localización, severidad y duración del déficit de perfusión (Bradberry y Phrarm, 1993). Un 25% de los pacientes con EVC aguda mueren después del primer mes y hasta un 50% de los sobrevivientes quedan física y mentalmente incapacitados (American Stroke Association, 2008). Se han desarrollado varias escalas para cuantificar la gravedad de los pacientes con EVC, entre la más utilizada se encuentran la National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), la cual consta de 11 parámetros que reciben un puntaje de entre 0 y 4, su resultado oscila de 0 a 39 y según la puntuación se cataloga en varios grupos:  $\leq 4$  puntos se considera déficit leve; 6 – 15 puntos, déficit moderado; 15 – 20 puntos déficit importante; y  $>20$  puntos, déficit grave (Arauz y Ruiz-Franco, 2012). En pacientes que se sospecha de la presencia de una EVC es esencial realizar estudios mediante diferentes técnicas de imagenología cerebral, como la Tomografía Axial Computarizada (TAC), la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), la Resonancia Magnética Funcional (RMF) o Angiografía Cerebral, las cuales son capaces en mayor o menor medida de localizar y detectar las EVC en sus diferentes fases y que a la larga producirán diferentes manifestaciones clínicas. Igualmente durante las fases agudas de la isquemia se deben realizar estudios de glucosa sérica, biometría hemática, tiempos de coagulación y electrocardiogramas. Entre las áreas comúnmente afectadas encontramos: ganglios basales (núcleos caudado y putamen), puente, cerebelo, corteza cerebral motora, corteza orbitofrontal, tallo cerebral, giro del cíngulo y cuerpo calloso (Delgado-García, 2009; Arauz y Ruiz-Franco, 2012).

Entre la gran variedad de alteraciones sensoriales y motoras se incluyen: temblores, pérdida de la coordinación, pérdida de la fuerza muscular, alteración del balance y la postura, parálisis parciales, síncope, apraxia, negligencia unilateral, problemas de visión como hemianopsia homónima y problemas en la deglución de alimentos (Caplan y Hon, 2004; Sien, Stein, Ning y Black-Schaffe, 2007). Entre las alteraciones neuropsicológicas más comunes pueden encontrarse: diferentes tipos de

afasias específicas (Broca, Wernicke o de Conducción), afasias globales que puede afectar todos los niveles del lenguaje, hemiparesia contralateral con predominio en miembros inferiores, cambios conductuales, agnosias, prosopagnosias, alexias y disartrias que conllevan a una limitación en las habilidades necesarias para escuchar, leer y escribir (Ostrosky-Solís y Ardila, 1991; Glubb, et al., 2000).

En lo que respecta a las alteraciones del aprendizaje y la memoria, estudios clínicos observan varias disfunciones corticales en pacientes con isquemia cerebral, las más frecuentes son amnesias, demencias y problemas en la atención (Tatemechi, Desmond, Stern, Paik, Sano y Bagiella, 1994; Rogers, Campbell, Stretton y Mackay, 1997). Por su parte los experimentos realizados en modelos animales han sido de gran importancia para el conocimiento sobre el daño neuronal durante y después de la isquemia cerebral. La evaluación de los animales en tareas relacionadas con el aprendizaje y la memoria, se han lleva a cabo a través de laberintos, como el Laberinto Acuático de Morris (MWM) o el Laberinto en Y, los cuales demostraron afectaciones en la memoria de trabajo y en la memoria de referencia provocadas por isquemia cerebral, las cuales con el tiempo una recuperación en ambos tipos de memoria. Aunque los déficits en la memoria de trabajo pueden persistir después de algunos días una isquemia global, igualmente pueden estar afectando algunos déficits locomotores en los animales (Modo, et. Al., 2000; De Vires et al., 2001; Nithianantharajah y Hannan, 2006).

## 2.5. Modelos experimentales en animales con isquemia cerebral.

Gracias a las manifestaciones clínicas y a la identificación de los déficits cognitivos provocados por la isquemia cerebral, se han desarrollado diferentes líneas de investigación en modelos experimentales con animales. Un modelo experimental puede definirse como un medio artificial donde el objetivo de estudio es reproducir un fenómeno. para verificar si la hipótesis sobre el mismo puede reproducirse en condiciones controladas. El objetivo de los modelos en isquemia cerebral es adquirir conocimiento sobre la patofisiología del daño cerebral isquémico, además de identificar los efectos de los fármacos neuroprotectores. Un modelo ideal para el daño isquémico

debe: a) reproducir la situación clínica; b) ser reproducible en sí mismo; c) estar libre de falsas interpretaciones y d) no ser excesivamente dependiente de recursos tecnológicos lejos del alcance de la mayoría de los laboratorios de investigación en el mundo (Hossmann, 2006). La similitud del encéfalo humano con otros mamíferos ha permitido modelar la isquemia cerebral y otras enfermedades del sistema nervioso central. Los encéfalos de perros, gatos y primates son los más parecidos al humano, pero el mantenimiento de los animales es alto y se deben tener en condiciones especiales. Los modelos en roedores son los más utilizados, por su facilidad, costo, aceptación ética y alto grado de homología genética. A pesar de tener un cerebro liso, los inconvenientes con el cerebro del roedor se han solucionado gracias a las técnicas de imagenología cerebral y neurofisiología (García, 1984; Juurlink y Sweeney, 1997; Dinal et al., 1999).

En la mayoría de las investigaciones en isquemia cerebral se emplea como común denominador la inducción de isquemia cerebral en modelos focales, usando comúnmente la obstrucción de la arteria cerebral media (ya sea de manera transitoria o permanente), lo cual permite la identificación de déficits en zonas específicas (Bederson, Pitts, Tsuji, Nishimura, Davis y Bartkowski, 1986; Menzies, Hoff y Betz, 1992; Niuro, Roger, Koki y Tetshiko, 1996; Modo, Stroemer, Tnag, Veizilc, Sowniski, y Hodges, 2000). Los modelos de isquemia cerebral de tipo global reproducen EVC extracraneales, como paros cardiacos y colapsos vasculares sistémicos (Sosa, García-Salman, Rodríguez, Subir's, Rodríguez y Thomas, 2005). Su principal característica radica en mantener el flujo sanguíneo del tallo cerebral, permitiendo a los animales ventilar espontáneamente, mientras que se obstruyen las arterias carótidas comunes, lo cual puede afectar áreas cerebrales muy extensas (Block, 1999; Hunter, Green y Cross, 1995; Rodríguez, Santiago-Mejía, Fuentes-Vargas y Ramírez 2003; Trasystman, 2003). Existen en la literatura pocos modelos que evalúen el efecto de una isquemia global y permanente, bajo un esquema de hipoperfusión sanguínea. Algunos de los modelos de isquemia global son la oclusión de dos vasos con y sin hipotensión (2OV+hypo; 2VO) y la oclusión de cuatro vasos (4VO) (Hossmann, 2008; Prieto-Arribas, 2008; Pulsinekki, Brierly y Blum, 1982).

## 2.6. Modelo de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes (SSACC).

La mayoría de los modelos de isquemia cerebral se han enfocado en el tratamiento neuroprotector con el objetivo de evitar la muerte neuronal del tejido que forma la zona de penumbra. Sin embargo, se han generado varias críticas relacionadas con las consideraciones metodológicas. Una de las principales causas de disparidad que se observa es en relación con los resultados clínicos, en donde, ningún modelo reproduce fielmente los hallazgos observados en la isquemia cerebral humana (Fisher, 2004; Alejo-Martínez, 2011). Hoy en día se trabaja en modelos que puedan trasladarse a la clínica, entre los más exitosos encontramos a los modelos de isquemia global en animales, entre los cuales se encuentra el modelo de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes o SSACC.

### 2.6.1. Características del modelo de la sección secuencial de las arterias carótidas comunes (SSACC).

El modelo de Sección Secuencial de Arterias Carótidas (SSACC) fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Rodríguez Carranza del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM (Rodríguez, Gerson y Santiago-Mejía, 2000). El SSACC es un modelo de isquemia global incompleta debido a que la interrupción sanguínea solo afecta al sistema carotídeo, permaneciendo constante la circulación del sistema basilar, que irriga a los centros cerebrales reguladores de las funciones vitales. El procedimiento se lleva a cabo en dos etapas: en la primera, se liga y secciona la arteria carótida común izquierda y 32 días después se realiza el mismo procedimiento con la arteria carótida derecha (Rodríguez, Gerson y Santiago Mejía, 2000; Delgado-García, 2009; Alejo-Martínez, 2011).

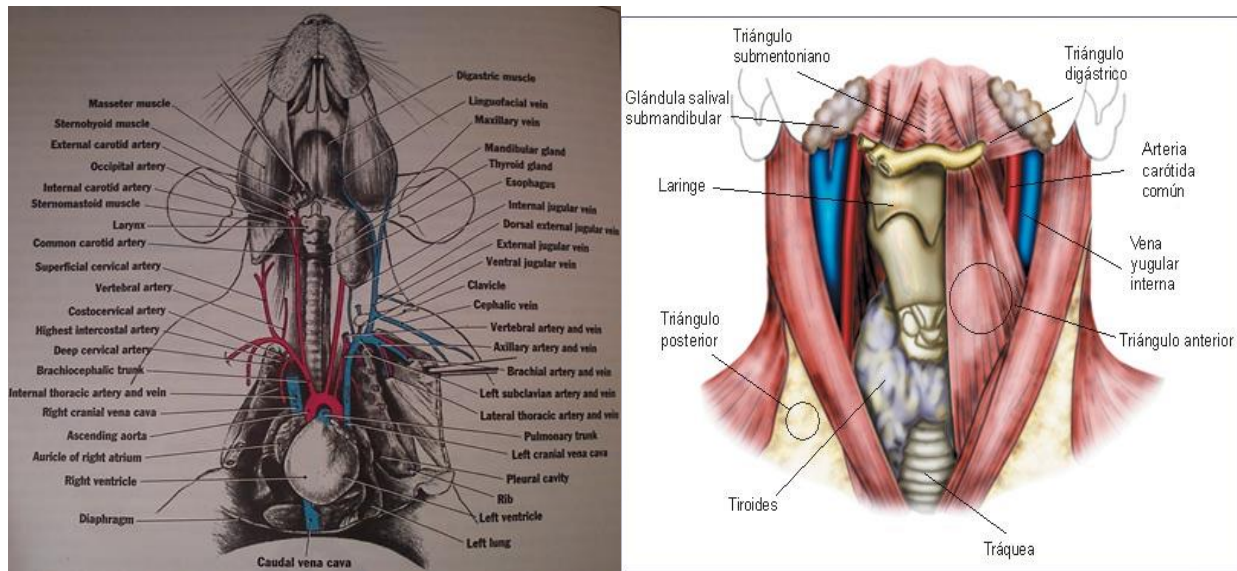
Las dos diferencias básicas de este modelo con respecto a los modelos tradicionales de isquemia cerebral son: 1) empleo de animales envejecidos (40-60 semanas de edad), lo cual los vuelve más vulnerables al daño isquémico (Fuertes-Vargas, et. al., 2002) y 2) el intervalo temporal de 32 días entre la oclusión de ambas

arterias carótidas, lo que posibilita una simulación de lo que ocurre en la clínica con los pacientes que sufren una EVC, en un estado crónico de hipoperfusión cerebral. El estudio en modelos isquémicos globales cuya reducción sanguínea es crónica como el modelo SSACC, es de vital importancia para comprender la evolución, consecuencias y respuestas del infarto a cualquier tratamiento farmacológico, a diferencia de los modelos de instalación súbita (Rodríguez et al., 2000).

El empleo de roedores en los experimentos de isquemia cerebral ha sido una constante al facilitar, por un lado el mantenimiento y cuidado de los animales en los bioterios y por el otro por las similitudes anatómicas que existen con lo humanos. En lo que respecta al sistema circulatorio, la posición de las arterias cerebrales y carótidas es muy similar entre los roedores y el ser humano (Fig. 7). La conformación del polígono de Willis es muy parecida en los humanos en comparación a los roedores, con algunas diferencias anatómicas como la ausencia de la arteria comunicante anterior las cuales forman un tronco cerebral anterior, además de la presencia de arterias colaterales (especialmente la arteria olfatoria, muy desarrollada en roedores). Algunos autores han considerado las variaciones de las arterias colaterales o la formación de anastomosis como los principales factores para la utilización de diferentes animales de laboratorio (Lee, 1995; Lugo-Sira, 1996; Farkas y Luiten, 2001).

El empleo de ratones machos envejecidos es relevante en el modelo SSACC, al demostrar una serie de patrones conductuales y morfológicos que se deben observar durante una isquemia global. Se caracterizó un polígono de Willis completo de tipo embrionario en ratones sometidos al SSACC, además de un ensanchamiento en las paredes de las arterias que conforman el polígono de manera homogénea (Lugo-Sira, 1996; Rodríguez et al., 2000). La sección de la carótida izquierda de los ratones durante la primera cirugía, produce un aumento gradual en el diámetro de las arterias que conforman el polígono de Willis, lo que a su vez genera vasogénesis que ayuda a la compensación del flujo sanguíneo (Kandel et al., 2000; Rodríguez et al., 2000); lo cual a su vez prolonga el tiempo de vida de los animales, permitiendo el estudio de las alteraciones cognitivas y conductuales, además del empleo de fármacos que modifiquen estas alteraciones (Rodríguez et al., 2005). El inconveniente de utilizar otro

tipo de roedores en el modelo SSACC radica en el alojamiento de los animales, un diferente metabolismo y el en el caso de la rata, un prominente uso de las arterias colaterales que forman una anastomosis en el polígono de Willis que ayudan a compensar la interrupción del flujo sanguíneo cuando las arterias carótidas son cortadas (Lee, 1995; Lugo-Sira, 1996).



**Fig. 7.** Comparación anatómica del sistema carotideo en el ratón y el ser humano. Este sistema es la clave para el modelo de sección secuencial de arterias carótidas (SSACC), debido a que el corte de las arterias carótidas, ubicadas en ambos casos a un costado de la laringe y tráquea, en un periodo de tiempo de 32 días entre arterias, le permite al modelo simular en el animal una isquemia cerebral global (Rodríguez et al., 2000).

## 2.6.2. Alteraciones conductuales producidas por el modelo SSACC.

Los estudios enfocados en isquemia cerebral aguda, centran su atención en la identificación y caracterización de las alteraciones neuroconductuales inducidas por la isquemia cerebral aguda, además del papel de los fármacos neuroprotectores en la sobrevivencia del tejido de la zona de penumbra. Los resultados obtenidos al administrar diferentes fármacos en modelos experimentales son alentadores, pues han sido capaces de reducir el tamaño de infarto en los animales, sin embargo, al trasladar su empleo a la clínica se observa poca efectividad en los pacientes con una EVC (Green, Odergren y Ashwood, 2003). A diferencia de otros modelos de isquemia, el

modelo SSACC induce una gran cantidad de alteraciones neuroconductuales que ofrecen la oportunidad de evaluar el impacto funcional de la isquemia cerebral aguda y su posible recuperación después de la administración de fármacos neuroprotectores (Rodríguez et al., 2003). Las primeras investigaciones utilizando el modelo SSACC dieron como resultado la presencia de diez alteraciones consistentes y definidas tras el corte de las 2 arterias carótidas. Estas alteraciones son: incoordinación motora, posición corporal anormal (lateralizada), hipomotilidad, disminución del tono y fuerza muscular, temblor, encorvamiento, flexión de la extremidad anterior y marcha atáxica (Rodríguez et al., 2000; Rodríguez, Santiago-Mejía, Gómez y San-Juan, 2005).

La alteración de la actividad locomotora en los animales isquémicos en comparación con los animales controles es una constante dentro del modelo SSACC. Los primeros resultados obtenidos demostraron una disminución significativa de la actividad locomotora tanto de tipo exploratoria como espontánea en los animales con SSACC. Después de aplicar agentes antioxidantes a los animales afectados por SSACC, estos mostraron un aumento en su actividad locomotora en comparación a los animales controles a los cuales solos se les administro solución salina (Santiago-Mejía, Fuentes-Vargas, Ríos, Vidrio y Rodríguez, 2004). En este sentido, el modelo SSACC encontró evidencia de problemas de hemiparesis o hemiplejía, al evaluar la capacidad de los animales isquémicos para manipular, abrir y consumir una semilla de girasol. Los resultados obtenidos demuestran que los animales isquémicos presentan alteraciones motoras finas (en patas anteriores y falanges) que les impide sostener y manipular la semilla de Girasol (Gómez, Santiago-Mejía, Ventura-Martínez, y Rodríguez, 2006). La sensibilidad táctil de los animales experimentales sometidos a SSACC se ve disminuida (Gómez, Santiago-Mejía, y Rodríguez, 2005). En lo que respecta a la conducta de nado, se encontrado alteraciones motoras no reversibles en los animales sometidos a SSACC después de 72 horas efectuada la segunda cirugía, los parámetros de la latencia de nado, distancia recorrida y velocidad de nado aumentaron significativamente en los días posteriores a la segunda cirugía, sin embargo al administrar el fármaco neuroprotector dexrazozano (que es un antioxidante), los animales isquémicos mejoraron en la conducta de nado. Actualmente

la línea de investigación en el modelo SSACC va en función de la identificación y caracterización las alteraciones del aprendizaje y memoria en animales isquémicos. El primer trabajo evaluó a los animales con la prueba de Laberinto Elevado en Cruz, herramienta que resultó ser muy útil en la identificación y caracterización de las alteraciones en la ejecución y recuerdo inducidas por isquemia cerebral aguda (Alejo-Martínez, 2011).

## 2.7. Estrategias experimentales para el estudio del aprendizaje y la memoria.

Para poder desplazarse en su medio de manera eficaz los animales deben aprender y recordar la distribución de su medio que les permita localizar los espacios abiertos, las áreas de refugio, las fuentes potenciales de alimentos, la ubicación de su nido, el alimento almacenado, los depredadores, etc (Cabrera, 2009).

El aprendizaje puede considerarse como un proceso que facilita la adaptación de las especies en su entorno. Aprender no solo significa adquirir conocimiento o recibir información determinada; también el aprendizaje debe ser capaz de afectar a todos los tipos de comportamiento (motor, emocional y cognitivo). Los comportamientos aprendidos deben distinguirse de otros tipos de comportamientos, como los comportamientos innatos (pautas de comportamiento determinadas biológicamente y que son importantes para la supervivencia de los organismos) y los comportamientos madurativos (cambios estables en el comportamiento que se producen como consecuencia del desarrollo evolutivo, de acuerdo con pautas biológicamente determinadas). El comportamiento aprendido es un concepto que se puede definir como un cambio perdurable en las respuestas a una situación en particular, que es resultado de una experiencia anterior. La clasificación más utilizada para el aprendizaje es dividirlo en tres: aprendizajes no asociativos, aprendizajes asociativos simples y aprendizajes asociativos complejos (Domjan, 2008; Vila, 2009).

Los aprendizajes no asociativos son cambios en la conducta como resultado de la repetición de estímulos, entre los que se encuentran la habituación y sensibilización.



En la habituación se aprende a ignorar un estímulo que carece de significado, mientras que en la sensibilización se aprende a intensificar a todos los estímulos, incluso los que provocaban poca o nula respuesta. Por su parte, los aprendizajes asociativos simples son cambios en la conducta como consecuencia de la asociación de dos estímulos, llamado condicionamiento clásico, o la asociación entre una conducta y un estímulo consecuente con dicha conducta, denominado condicionamiento instrumental (u operante). Por último los aprendizajes asociativos complejos son cambios de la conducta exclusivos del ser humano y mediados por el lenguaje (Bear, 2008). Gran parte del trabajo de investigación que se realiza en esta área se ha enfocado en el descubrimiento de reglas generales, que describan cómo los animales modifican su conducta a partir de la interacción con el ambiente, al igual que cómo almacenan información nueva que posteriormente guían su conducta (Domjan, 2003).

Para solucionar exitosamente los paradigmas experimentales los sujetos deben emplear mecanismos de memoria, que les permita recordar cuales son las reglas generales y específicas de una tarea que, los llevará a obtener estímulos agradables o evitar estímulos nocivos (Domjan, 2003). La memoria es un concepto estrechamente relacionado con el aprendizaje, los investigadores suelen manejarlos como conceptos que se llevan a cabo de manera conjunta (Oyuela et al., 2004), sin embargo, mientras el aprendizaje es este cambio permanente y relativamente estable en el comportamiento, la memoria puede ser entendida como la retención de la información aprendida. Existen diferentes clasificaciones de la memoria según el enfoque desde el cual se esté estudiando; puede clasificarse a la memoria basados en las observaciones clínicas, en las pruebas experimentales y neuropsicológicas ó en sus bases anatómicas y fisiológicas (Carrillo-Mora, Giordano y Santamaría, 2009). Sin embargo, una de las clasificaciones más utilizadas es dividir a la memoria en dos grandes grupos: memoria declarativa (o explícita) y memoria no declarativa (o implícita). La memoria declarativa, es la memoria de los hechos y acontecimientos; mientras que la memoria no declarativa puede tener numerosas categorías, siendo la memoria procedimental (habilidades, hábitos y comportamientos) la más sobresaliente (Bear, 2008).

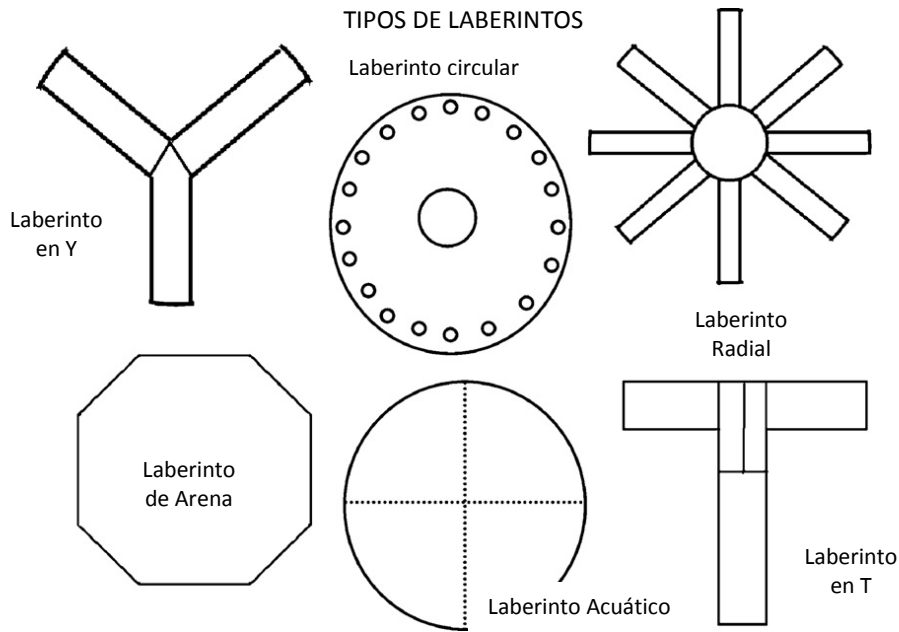
Ciertas regiones del encéfalo son mucho más importantes que otras para los diferentes tipos de memoria, almacenándose en diferentes sistemas neurales (Kandel, Schwartz y Jessell, 1997). Entre las zonas cerebrales más relacionadas con el procesamiento de la memoria encontramos al lóbulo temporal medial, siendo el hipocampo, las áreas próximas a él y las vías que conectan estas estructuras a otras partes del cerebro las más importantes. Los núcleos anterior y dorsomedial del tálamo y los cuerpos mamilares del hipocampo son otras zonas relacionadas con la memoria (Bear, 2008). La memoria no es una función estática y puede describirse mejor si se le considera como una red compleja que trabajan en conjunto para clasificar, codificar, almacenar y recuperar una diversidad de información que adquieren los sujetos (Hebb, 1949, citado en Bear, 2008).

En el año de 1900, los fisiólogos Müller y Pilzicker determinaron que el establecimiento de la memoria ocurre en dos estadios diferentes: una memoria de corto plazo (también llamada memoria inmediata) y una memoria de permanencia llamada memoria de largo plazo o memoria remota. La información sensorial se puede retener temporalmente en la memoria inmediata, pero para conservarla permanentemente en la memoria remota se requiere de un proceso llamado consolidación de la memoria. Cuando la información sensorial logra pasar a la memoria remota (ya sea de manera directa o a través de la memoria inmediata) los recuerdos almacenados, llamados remotos pueden mantener durante días, meses o años (Oyuela et al., 2004; Bear, 2008). La memoria de trabajo se puede definir como la una memoria a corto plazo para un objeto, estímulo o ubicación, este tipo de memoria es de corta duración (desde algunos segundos, hasta horas e incluso días) y tiene capacidad limitada que requiere de ensayos para la retención de la información. La memoria de trabajo es empleada por los organismos dentro de una sesión experimental, debido a que integra aspectos transitorios y cambiantes del ambiente que, controlan la conducta momento a momento durante los ensayos y pierde su efecto al término del ensayo (Cabrera, 2009; Domjam, 2003; Dudchenko, 2004; Roberts, 1998).

Para fines experimentales, la clasificación de los mecanismos de memoria se realiza en función de lo que se recuerda, los contenidos de la memoria y el tiempo que

se recuerda o intervalo de retención (Domjam, 2003; Dudchenko, 2004; Roberts, 1998). Las tareas comúnmente empleadas para el estudio de la memoria deben considerar la forma en que los animales recuerdan una serie de sucesos diferentes. La mayoría de las investigaciones se centran en la fase de retención y recuperación de la información adquirida. Los experimento de aprendizaje y memoria comparten ciertas características dentro de la codificación de la información. La primera característica, es llamada la fase de retención, en donde ocurre la exposición de los organismos a cierto tipo de información. Posteriormente, la información adquirida se retiene por cierto tiempo, llamado intervalo de retención, al cabo de dicho intervalo, se evalúa el recuerdo que los sujetos tienen de la experiencia original, lo que implica recuperación o reactivación de la información encontrada durante la adquisición. Por lo tanto, las fases implicadas son tres: adquisición, retención y recuperación (Carrillo-Mora et al., 2009).

Los laberintos son los dispositivos más utilizados para evaluar el aprendizaje y la memoria en animales (Fig. 8), al utilizar roedores aprovecha su tendencia natural de explorar espacios cerrados y pequeños, así como la evitación de espacios abiertos y elevados. Tolman en 1948 propuso que después de un periodo de entrenamiento, los animales pueden establecer verdaderas estrategias para resolver los laberintos y son capaces de elaborar mapas mentales (Tolman, 1948, citado en Carrillo-Mora et al., 2009). Por esta razón además de la memoria de trabajo, la memoria espacial y la memoria de referencia, son las más estudiadas en el uso de laberintos. La memoria espacial puede ser definirse como el almacén del cerebro para reconocer, codificar, almacenar y recuperar información de tipo espacial, que actúa sobre la disposición de los objetos o rutas específicas, con respecto a señales ambientales. Tiene la capacidad de crear mapas cognitivos que son utilizados por la memoria de referencia para la solución de problemas. La memoria espacial no se asigna estrictamente a un subsistema de clasificación de la memoria, debido a que puede un componente tanto de la memoria declarativa como de la memoria no declarativa, además de estar involucrado en procesos de largo y corto plazo (Roberts, 1998; Domjan, 2003; Dudchenko, 2004; Carrillo-Mora et al., 2009).



**Fig. 8.** Diferentes tipos de laberintos utilizados para evaluar memoria (Carrillo-Mora et. al., 2009).

### 2.7.1. Laberinto Radial (RAM, por sus siglas en inglés).

El laberinto radial (RAM) fue desarrollado por Olton y Samuelson en 1976, como prototipo para una tarea de solución de varios problemas. Consta de ocho brazos que irradian de una plataforma central que facilita el acceso a los brazos. Alrededor de cada la plataforma, en la entrada de cada uno de los brazos se encuentra una puerta guillotina que se levanta, para permitir que el animal ingrese al brazo, o baja, para evitar que el animal regrese al brazo. También contiene una barrera entre los brazos cerca a la plataforma central para evitar que el animal salte de un brazo a otro, lo cual lo obliga a ir a la plataforma central antes de que elija otra opción. Antes de cada sesión se coloca un pellet al final de cada brazo, se sitúa al animal en el centro del laberinto con las puertas guillotinas cerradas, entonces se levantan todas las puertas; la rata elige un brazo y corre hacia el final de este para comer el pellet. Las puertas de los brazos restantes se cierran, la rata vuelve al centro y la puerta del brazo visitante se baja, después de un intervalo de demora se levantan todas las puertas. Este procedimiento se repite hasta que los animales logran algún criterio (Olton y Samuelson, 1976; Olton, 1987; Domjan, 2003; Carrillo-Mora et al., 2009). El objetivo de

esta tarea es medir la habilidad de las ratas para recordar una lista de ubicaciones espaciales (Block, 1999).

### 2.7.2. Laberinto Acuático de Morris (MWM, por sus siglas en inglés).

Como una alternativa al laberinto radial, en 1981, Richard G. M. Morris creó el llamado laberinto acuático de Morris (MWM), el cual ha sido uno de los más utilizados para estudiar la memoria espacial, de trabajo y de referencia en roedores. Esta tarea se diseñó para medir la habilidad de las ratas para aprender, recordar y dirigirse a un lugar en el espacio, definido únicamente por su posición relativa señale distales extralaberínticas (Morris, 1984). El laberinto consiste en una gran alberca circular que contiene agua opaca, la cual oculta una plataforma a unos cuantos centímetros. El procedimiento tradicional para medir la memoria consiste en dividir la piscina en cuatro cuadrantes iguales, y dado que el agua representa un estímulo aversivo para los roedores, puede someterse a los animales a un periodo de habituación, en donde se les sumerge durante unos minutos sin la plataforma. Después de este periodo una plataforma se coloca fija en uno de los cuadrantes y los animales pasan por un periodo de adquisición. Durante este periodo a los animales se les da un número variable de ensayos. Al comienzo de cada ensayo se les coloca a los animales en diferentes posiciones de partida. Se registra el tiempo en que el animal tarda en encontrar la plataforma. Para favorecer el aprendizaje en el animal, se le permite estar en la plataforma durante 30 a 60 segundos. Después del entrenamiento la memoria y la recuperación es evaluada en un ensayo adicional; es posible evaluar la memoria de trabajo si cada día se modifica la posición de la plataforma dentro de la alberca (Morris, 1984).

### 2.7.3. Laberinto en Y o T.

Se considera que Tolman fue el primero en utilizar este paradigma (1925, citado en Dudchenko, 2004). Se evalúa a los animales en pares de ensayos en los que la información reunida durante el primer ensayo debe ser recordada para tener éxito en un segundo ensayo. Se aprovecha la tendencia natural de los roedores de la alternancia espontánea, que se considera como un parámetro observatorio en ambientes nuevos. Tanto en el laberinto de Y o T a los animales se les permite explorar libremente. En la mayoría de las versiones se coloca a los animales en la base de la Y o T, donde deben correr hasta ingresar en alguno de los brazos del laberinto donde recibirá un reforzador (primer ensayo). Tras su ingreso se coloca al sujeto en la base del laberinto para realizar un segundo ensayo, en donde ambos brazos son accesibles, pero la rata obtendrá el reforzador solo en el brazo con el alimento. En este procedimiento se evalúa memoria espacial, cuando el animal tiene que recordar el lugar con el reforzador fijo, pero igualmente se puede evaluar memoria de trabajo cuando el reforzador puede variar de brazos y se agrega un tiempo de demora entre ensayos (Gerlai, 1996; Corbett y Nurse, 1998; Dudchenko, 2004; Carrillo-Mora et al., 2009).

### 2.8. Modelo de laberinto acuático en Y.

El laberinto en forma de Y al igual que el laberinto en T, han sido utilizados para la evaluación de la memoria espacial, al permitir observar procesos de reconocimiento espacial en los animales a través de tareas de discriminación. La variable acuática de estos laberintos permite respuestas comportamentales más consistentes, además de ser sensible al aprendizaje espacial, pues combina las ventajas del laberinto acuático de Morris y del Laberinto en Y. Mientras que en el laberinto acuático de Morris, al animal entrena para encontrar una plataforma escondida utilizando pistas visuales; en el laberinto en Y, el animal debe elegir un brazo para recibir un reforzador y no un castigo. En esta tarea uno de los brazos del laberinto se encuentra una plataforma sumergida (la cual funciona como un reforzador positivo), aprovechando la tendencia natural de los roedores al evitar el agua (reforzador aversivo), los animales deben

aprender a alternar en orden y encontrar la ruta exacta para encontrar la plataforma. Si el animal no es capaz de elegir la ruta espacial correcta durante el periodo de entrenamiento, se cierra el brazo que no contiene la plataforma y al animal se le mantiene por 10 s en el agua, repitiéndose la tarea hasta que el animal logre recordar la ruta correcta. La variable acuática del laberinto en Y ha sido muy poco explorada, pero bastante exitosa para las valoraciones farmacológicas referentes a memoria espacial y memoria de trabajo (Lochhi, Dall'Ollio, Gandolfi y Rimondini, 2007; Who, Hong y Kil, 2008; Mora, Giordano y Santamaría, 2009).

## 2.9. Neuroprotección.

La neuroprotección puede ser entendida como una estrategia de tratamiento terapéutico, cuyo objetivo principal es prevenir u oponerse a la pérdida neuronal patológica que ocurre en diferentes enfermedades del SNC y con ello preservar la integridad funcional del cerebro (Sirén y Ehrenreich, 2001), en el caso de la isquemia cerebral, la neuroprotección debe actuar en favor de la preservación de las células de la zona de penumbra que es afectada por el foco isquémico (Shuterland et al., 2012). Para los neurólogos una ventana terapéutica aceptable para un neuroprotector está entre 4 y 6 horas posteriores a la EVC, los mecanismos más prometedores dentro de la neuroprotección son los que actúan en la recanalización del flujo sanguíneo evitando la formación de coágulos de sangre, a pesar de no actúan de manera directa en el tejido cerebral, mantienen el flujo de sangre en niveles adecuados; satisfaciendo la demanda metabólica y evitando el inicio de la cascada isquémica. Los tratamientos que actúan directamente sobre el tejido celular, también actúan en los procesos de la cascada isquémica para evitar la muerte neuronal (Shuterland et al., 2012).

### 2.9.1. Fármacos Neuroprotectores.

Uno de los principales abordajes clínicos y experimentales para el estudio de la neuroproteccion se hace a través de la utilización de fármacos que intervienen en la

cascada bioquímica del daño isquémico. Los estudios con estos fármacos se centran especialmente en la protección celular temprana para mantener el flujo sanguíneo cerebral en niveles adecuados. Existen diferentes tipos de fármacos utilizados para la neuroprotección, entre los que encontramos inhibidores de la liberación de glutamato (como la Fosfenitoina, Lubeluzone y Lifariza), antagonistas de los canales de Ca<sup>2+</sup> (Nimodipino, Flunaricina, Nicardipio y Isradipino), antagonistas de los receptores NMDA (Selfotel, Dextrofan, Aptiganel, Eliprodil, Gavestinel, Dizolcipina y NBQX), hiperpolarizantes de las membranas neurales (Crometiazol y MaxiPost), antioxidantes (Tirilazd y Ebselen), protectores de membranas celulares (Citocolina y Pirecetam), antiinflamatorios (Enlimomab y Hu23F26) y antitrombóticos, trombolíticos y antiplaquetarios (activador tisular del plasminógeno), los cuales son los más utilizados en el tratamiento de la isquemia cerebral (Castillo, 2003). Estos fármacos actúan de manera endógena o exógena en favor de la preservación temporal de la zona de penumbra al acortar el tiempo entre el inicio del evento isquémico y la restauración del flujo sanguíneo (Arango-Dávila et al, 2004).

### 2.9.2. Neuroprotección en la clínica.

En la clínica se espera que además de incrementar la sobrevivencia de los pacientes que han sufrido isquemia cerebral, también se mejore su la calidad de vida. La neuroprotección a través de fármacos neuroprotectores ha mostrado resultados prometedores en los estudios experimentales, pero no ha logrado traducirse con éxito a la clínica, los resultados en pacientes no han sido suficientemente satisfactorios o causan efectos adversos importantes (Delgado-García, 2009; Shuterland, 2012). Por este motivo, hasta el día de hoy no existe un fármaco que sea lo suficientemente efectivo, específico y de seguro acceso al SNC (Green et al, 2003; Hossmann, 2006).

La única terapia farmacológica aprobada para el tratamiento de la isquemia cerebral es la administración del activador tisular del plasminógeno (tPA), que actúa como un agente trombolítico, cuyo mecanismo de acción consiste en recanalizar el vaso obstruido para restablecer el flujo sanguíneo cerebral. La evidencias en ensayos



clínicos demuestran que los pacientes tratados con tPA, a dosis de 0.9 mg /kg, tienen una evolución funcional con recuperación completa o casi completa, comparados a los tratados con placebos. Para que su resultado sea efectivo debe administrarse durante las primeras 3 horas posteriores al evento isquémico; su principal desventaja es el riesgo de sufrir una hemorragia cerebral, principalmente aquellos pacientes que reciben el tratamiento posterior a las primeras 3 horas (Pérez y Biller, 2002; Durukan, 2008; Arauz y Ruíz-Franco, 2012).

La recanalización del flujo sanguíneo siempre será la mejor terapia contra la muerte celular tras una isquemia cerebral, sin embargo actualmente se están estudiando otros tipos de estrategias de neuroprotección como la hipotermia y el uso de albuminas (Shuterland, 2012). El uso de antioxidantes ha representado otra estrategia de la neuroprotección alentadora, al ser muy eficaz para la reducción del infarto (Santiago-Mejía, et al, 2004). El dexrazoxano, es un fármaco utilizado como cardioprotector, se trata de un quelante de metales empleado para reducir la cardiotoxicidad en la sangre (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los resultados observados sugieren que este fármaco tiene un potencial efecto neuroprotector en animales sujetos a isquemia cerebral global, al observarse una disminución en la mortalidad y en el déficit neurológico inducido por isquemia cerebral aguda (Rodríguez et al, 2000; Rodríguez, et al, 2003). Sin embargo, sus resultados en la clínica aún están por comprobarse.

Algunas de las razones del fracaso de los modelos experimentales de la neuroprotección por fármacos es la heterogeneidad de los infartos en pacientes (a diferencia de la homogeneidad de los animales experimentales), las diferencias en las administraciones de las dosis entre los pacientes y los animales, el método de acción de los fármacos en el organismo humano a diferencia de los animales, la falta de acuerdo metodológico entre la clínica y la preclínica, entre otras (Shuterland, 2012). Por esta razón se están buscando alternativas experimentales al uso de fármacos, que puedan ser llevadas con éxito a la clínica y ayudar tanto en la calidad de vida de los pacientes, como en la preservación de las funciones cognitivas o motoras dañadas por causa de una EVC.

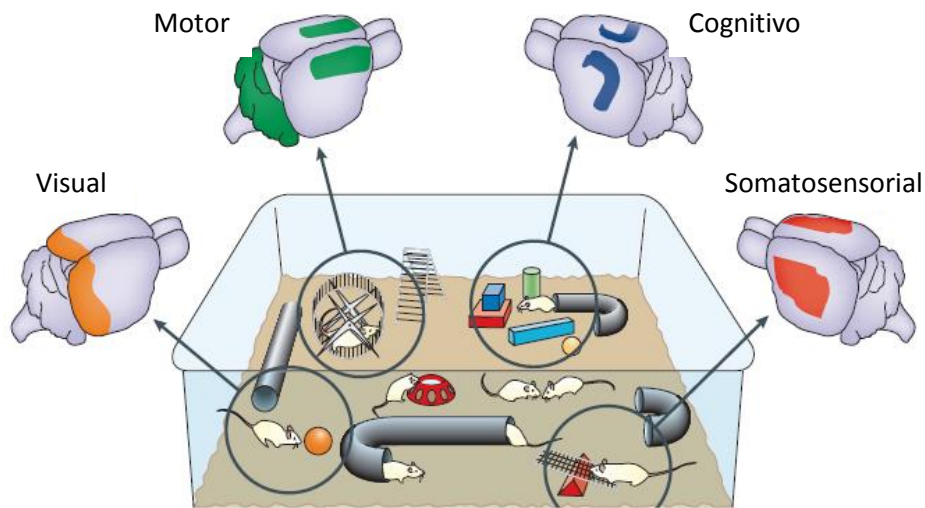
## 2.10. Modelos de ambientes enriquecidos.

El concepto de ambientes enriquecidos fue estudiado y descrito por primera vez por Donald Hebb en 1947, quien observó diferencias cualitativas entre dos grupos de ratas, un grupo control de ratas en su laboratorio, contra un grupo que llevó a su casa para que jugaran con sus hijos, dejándolas vagar libremente por su casa. A pesar de que de que esto podría considerarse un paradigma experimental un tanto incontrolado, este incluye lo que hoy en día son las características claves para los ambientes enriquecidos: un ambiente con mayor novedad y complejidad relativas a las condiciones estándar. Hebb encontró modificaciones en el comportamiento de las ratas sometidas a estos cambios ambientales, las cuales destacaron en una mejoría en la memoria y una alta capacidad para resolver problemas (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Cramer y Nudo, 2010; Reynolds, Lane y Richards, 2010).

Los ambientes enriquecidos involucran cambios en las cajas-habitaciones de los animales, proporcionando oportunidades para la interacción social, la percepción de estímulos, ejercicios voluntarios y desarrollo de capacidades cognitivas (Shono, 2011). Si bien los distintos laboratorios pueden utilizar diferentes protocolos, los ambientes enriquecidos son siempre espacios o cajas-habitaciones amplias, que permiten la exploración y la introducción de una variedad de objetos. Los objetos que son introducidos pueden variar en forma, tamaño, peso, olor y textura; entre los objetos utilizados pueden encontrarse tubos, plataformas de equilibrio, aparatos para escalar, pelotas o ruedas; estos objetos deben ser regularmente cambiados para mantener el concepto de novedad y complejidad (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Reynolds, Lane y Richards, 2010).

Rosenzweig (1962, citado en Reynolds, Lane y Richards, 2010) demostró que los ambientes enriquecidos están asociados con cambios morfológicos y bioquímicos cerebrales. Desde ese momento numerosos estudios han utilizado paradigmas de ambientes enriquecidos para estudiar mecanismos de plasticidad en el sistema nervioso central, dependientes de la experiencia, los cuales han demostrado jugar un papel de suma importancia para detener el impacto en enfermedades

neurodegenerativas en los sujetos experimentales, los modelos en animales han demostrado ser cruciales para la investigación de ambientes enriquecidos, los cuales se han utilizado para aumentar los niveles de estimulación sensorial, cognitivo y motor (véase Fig. 9) (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Reynolds, Lane y Richards, 2010; Shono et al., 2011; Cramer y Nudo, 2010).



**Fig. 9.** Ambientes enriquecidos y sus efectos en la mejoría sensorial, cognitiva y motora en las diferentes áreas cerebrales. El enriquecimiento puede provocar la activación neuronal, señalización y plasticidad a lo largo de varias regiones del cerebro. La estimulación sensorial se da a través de una mayor entrada somatosensorial y visual. Por su parte la estimulación cognitiva se induce por el reconocimiento de objetos novedosos y mapas espaciales. Adicionalmente la estimulación motora se desarrolla por de movimientos exploratorios (Tomado de Nithianantharajah & Hannan, 2006).

Los déficits motores han sido los más estudiados en los modelos de ambiente enriquecido. Cuando ocurre una lesión cerebral inducida por isquemia cerebral, se ha observado que el tamaño de la lesión manifiesta la magnitud inicial del déficit motor, pero no sus alteraciones crónicas, es aquí donde el papel de los ambientes enriquecidos es fundamental para la recuperación de la función (Kienling, Metz, Anthonow-Schlorke y Witte, 2009). Los ejercicios motores son esenciales para la recuperación funcional después de una EVC. Las terapias de rehabilitación motora (como el ejercicio forzado) han demostrado una mejoría en la recuperación de las habilidades motoras de los pacientes con una EVC (Kim et al, 2005, citado en Shono et al., 2011). Sin embargo también se han encontrado que estas terapias pueden producir

adaptaciones fisiológicas negativas inducidas por el estrés (Moraska et al, 2000, citada en Shono et al., 2011). Se ha demostrado que cuando una terapia motora es acompañada por un enriquecimiento adicional en la que existe estimulación sensorial, estimulación cognitiva e interacción social, se han demostrado una rehabilitación exitosa de las funciones motoras, aunque la función motora no es restituida en su totalidad, los ambientes enriquecidos facilitan la compensación de la motricidad en los animales expuestos a isquemia (Kienling et al., 2009; Shono et al., 2011).

La rehabilitación de las funciones cognitivas inducidas por los ambientes enriquecidos, se ha estudiado a nivel conductual a través del uso de laberintos los ambientes enriquecidos se ha estudiado a nivel conductual través de diferentes tipos de laberintos. Los más utilizados son los laberintos acuáticos, como el MWM o laberinto Radial Acuático. Se han encontrado déficits en la memoria o el aprendizaje de los animales sometidos a isquemia cerebral aguda, lo que les complica completar este tipo de tareas de manera exitosa, Esto está relacionado con la pérdida de células del hipocampo, zona muy sensible a la muerte neuronal después de la interrupción del paso sanguíneo (Nelson, Lebessi, Sowinski y Hodges, 1997). Se ha comprobado que el enriquecimiento atenúa de manera exitosa los déficits en el aprendizaje y la memoria inducidos por isquemia cerebral, los animales isquémicos expuestos al ambiente enriquecido ejecutan mejor las tareas de memoria en laberintos que los animales control, de igual manera el enriquecimiento es de vital importancia para la preservación del tejido celular, sin embargo, en el hipocampo no se ha encontrado una relación clara entre los ambientes enriquecidos y la neurogénesis de las células CA1 (Gobbo y O'Mara, 2004; Reynolds, Lane y Richards, 2010; Shono et al., 2011).

A nivel molecular los ambientes enriquecidos inducen cambios epigenéticos que favorecen la sinaptogénesis y neurogénesis (Belayev et al., 2003; Matsumori et al., 2006; Saucier, et al., 2007; Shono et al., 2011). El enriquecimiento induce la expresión de genes implicados en la función sináptica y plasticidad celular. Se aumentan los niveles de neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), que desempeñan un papel integral en la señalización neuronal. Rescata los déficits del receptor de glucocorticoides II y la

expresión genética del receptor de mineralocorticoides, normaliza los radios de los astrocitos, atenúa un déficit en la proliferación neuronal de la zona subventricular y aumenta el número de células madre neuronales putativas. La mayoría de estas nuevas células se han localizado como astrocitos u oligodendrocitos progenitores, las cuales forman una cicatriz de células glía en la zona del infarto, por lo que observa un mecanismo beneficioso para la reparación y plasticidad de la lesión. También aumenta la expresión de proteínas sinápticas y se alteran las subunidades de los receptores NMDA y AMPA, lo que permite un aumento en la fuerza sináptica (Komitova, Perfilieva, Mattson, Ericksson, y Johansson, 2006; Nithianantharajah, J. y Hannan, 2006; Zhang et al., 2013)-

Al demostrarse que los ambientes enriquecidos han ayudado de manera positiva a los animales experimentales que han sido sometidos a isquemia cerebral, en la rehabilitación de los componentes cognitivos, sensoriales y motores, se ha buscado llevar este tipo de terapias a la clínica con pacientes (Reynolds, Lane y Richards, 2010). En cuanto a los rangos de edad se ha observado que en los cerebros inmaduros que han sufrido daño neuronal por isquemia cerebral, la recuperación tras el accidente es más rápida y mejor que en los cerebros maduros, la edad tiene una gran influencia en la extensión del infarto y en su posterior recuperación, por esta razón se deben mejorar las terapias de acuerdo a la edad de los pacientes. Los modelos de ambiente enriquecido se están tratando de llevar a la clínica tomando en cuenta toda la investigación experimental, actualmente las terapias físicas y sensoriales han centrado la atención de los profesionistas para la recuperación de diferentes formas de deterioro y discapacidad, tras presentarse una EVC (Saucier, Yager, Armstrong, Keller y Shultz, 2007; Pinter y Brainin, 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN.

Tanto la identificación como la caracterización de las consecuencias del daño isquémico son difíciles de moldear con animales, en especial con roedores, debido a la complejidad de sus efectos y a la sutileza de los mismos. Esto dificulta la obtención de datos exactos que permitan determinar la presencia de alteraciones, cuantificar la severidad de la lesión y describir su evolución, Entre las restricciones de los modelos tradicionales de isquemia cerebral, que impiden su validez ecológica, se encuentran: 1) empleo de animales jóvenes, la población de más incidencia de EVC son adultos mayores de 45 años. 2) el uso de animales sanos, la mayoría de la población adulta se enfrenta a una serie de enfermedades propias de este grupo de edad, por lo que, las EVC no son las únicas enfermedades con las que deben tratar y 3) evaluación de parámetros cuantitativos, difiriendo de aspectos clínicamente importantes, como son el índice de supervivencia, la discapacidad neurológica y la recuperación funcional de los pacientes que logran sobrevivir a un EVC (Alejo Martínez, 2011). Las condiciones descritas anteriormente dieron como resultado el modelo de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes o SSAC, el cual retratan una EVC isquémica de tipo global con la utilización de animales viejos, los cuales suelen ser más exitosos en su traslado a la clínica con pacientes.

Se han probado diferentes fármacos neuroprotectores en modelos experimentales capaces de reducir el daño estructural y reducir el volumen del infarto; sin embargo, al usarse en la clínica como parte de tratamiento para la fase aguda, no se han encontrado efectos significativamente identificables, además de fallar en su uso clínico al no ser tolerados por los pacientes. El único fármaco aprobado para su uso clínico puede llegar a ser de difícil acceso para los pacientes. Por esta razón es importante el estudio experimental de nuevas terapias alternativas con efecto neuroprotector que puedan llevarse exitosamente a la clínica. En este sentido los modelos de ambiente enriquecidos, han proporcionado datos importantes en la recuperación tanto de la zona del infarto, como en la compensación neuroconductual de los animales experimentales, que han sido sometidos a EVC de tipo focal (Belayav, 2002; Knieling, 2009; Saucier, 2007).

## IV. MÉTODO

### 4.1. OBJETIVOS.

#### 4.1.1 Objetivo general.

Identificar y caracterizar el potencial efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en las alteraciones del aprendizaje y la memoria de los ratones macho envejecidos con isquemia cerebral aguda

1.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto de la isquemia cerebral aguda en el aprendizaje y la memoria de los animales con SSACC antes y después de la primera y la segunda cirugía, usando la prueba de laberinto en Y acuático.

2. Identificar el efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en el aprendizaje y la memoria de los animales isquémicos usando la prueba de laberinto en Y acuático.

3. Identificar el efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en términos del porcentaje de supervivencia.

4. Postular este modelo como una alternativa conductual terapéutica con efecto neuroprotector.

#### 4.2. Hipótesis de trabajo

1. La isquemia cerebral aguda inducida por la sección secuencial de arterias carótidas comunes produce alteraciones en la ejecución (aprendizaje) y en el recuerdo (memoria) de los ratones en la tarea de laberinto acuático en forma de Y.

2. Los ambientes enriquecidos reducen el déficit cognitivo inducido por la isquemia cerebral aguda después de la primera y segunda cirugía.

3. Los ambientes enriquecidos incrementan las curvas de supervivencia de los grupos experimentales después de la primera cirugía y segunda cirugía.

4. Los ambientes enriquecidos son una terapia eficaz en la neuroprotección de los animales isquémicos que puede trasladarse a la clínica.

#### 4.3. Variables bajo estudio.

##### 4.3.1. Determinación de variables.

*Variables dependientes:* número de errores y latencia de nado.

*Variables independientes:* Exposición al ambiente enriquecido (presencia, ausencia), condición experimental isquémica (Control, Sham y SSACC).

##### 4.3.2. Definición operacional y conceptual de variables.

###### a) Aprendizaje.

*Definición conceptual.* Cambio perdurable en las respuestas a una situación en particular como resultado de la experiencia anterior (Domjan, 2003).

*Definición operacional.* Igualación o superación en los parámetros establecidos durante la fase de adquisición, en relación al número de ensayos correctos.

###### b) Memoria Espacial.

*Definición conceptual.* Reconocimiento, codificación, almacenamiento y recuperación de la información espacial sobre la disposición de los objetos o rutas específicas (Carrillo-Mora, Giordano y Santamaría, 2009).

*Definición operacional.* Ingreso al brazo con la plataforma (reforzador), lo cual implica un recuerdo de la tarea, en relación al área de trabajo en el laberinto, se puede observar en un menor número de errores durante la fase de recuperación.



#### 4.4. Animales.

En cada grupo experimental se utilizaron ratones macho envejecidos de 40 a 60 semanas de edad, provenientes de la cepa CFW (obtenidos inicialmente de la casa Taconic Farma Germantown, NY) de 35 a 55 g de peso corporal, adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se colocaron en una misma sala con temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), humedad relativa ( $55 \pm 3\%$ ) y con un ciclo de luz-oscuridad normal (luz de 7 a.m. a 7 p.m.). Se permitió que los animales se aclimataran a las condiciones ambientales de la sala por una semana, previa a los experimentos. Durante todo el experimento se proporcionó libre acceso al agua y alimento (Purina Chow, St. Louis, MO, USA). Al menos una hora previa a los experimentos el alimento fue retirado, manteniendo libre el acceso al agua. Todos los experimentos se efectuaron conforme a la ética experimental establecida en el Reglamento de la Ley General en Materia de Investigación para la Salud en México (NOM – 062 – ZOO – 1999; Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de Animales de Laboratorio; Secretaria de Salud, 1999). Para la muestra inicial, para cada grupo se realizó asignación aleatoria; sin embargo, a partir de la fase de entrenamiento los animales fueron asignados a grupos experimentales específicos.

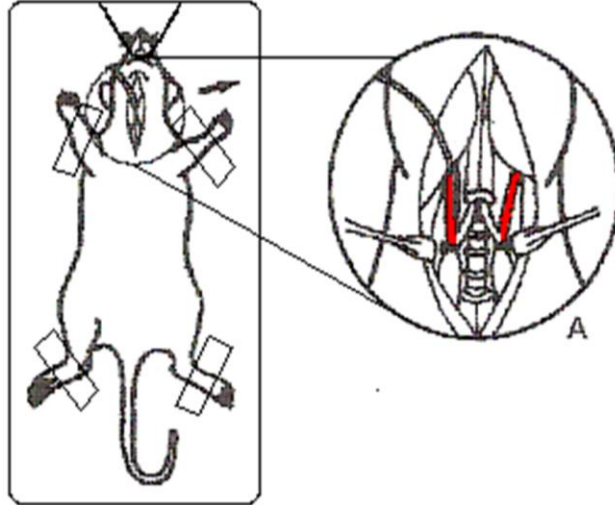
#### 4.5. Diseño experimental.

El siguiente experimento es un Diseño Factorial Mixto de 2x (3x8). En donde el factor A es el Ambiente Enriquecido que consta de dos niveles: presencia y ausencia. Mientras que el factor B es la Condición Experimental Isquémica, que consta de 3 factores: SSACC, Sham y Control. A los animales que conforman estos grupos se les sometió a la prueba en el laberinto de Y acuático en línea base y a las 24, 48 y 72 horas después de efectuadas las cirugías. Se ocuparon un total de 100 animales que fueron divididos (aleatoriamente) en función al Factor A, 50 animales para el grupo de ambiente enriquecido y otros 50 animales para el grupo de no ambiente enriquecido. A partir de estos dos grandes grupos, se realizó una nueva división en función al Factor B, tanto para los animales con ambiente enriquecido, como para los animales sin ambiente

enriquecido la asignación a los grupos fue la siguiente: 25 animales asignados a la condición SSACC, 15 a la condición Sham y 10 a la condición La asignación de los animales a los grupos experimentales se realizó de manera aleatoria y permanecieron en estos grupos hasta finalizar el experimento.

#### 4.6. Procedimiento quirúrgico.

La isquemia cerebral aguda se produjo mediante el procedimiento de Sección Secuencial de Arterias Carótida (SSACC; Rodríguez, Rodríguez et al., 2000). En este procedimiento bajo anestesia leve con éter, se realizó una incisión en la cara anterior del cuello, para después proceder a separar cuidadosamente la arteria carótida común izquierda del nervio vago, y por último, bajo dos ligaduras se secciona la arteria, excepto el grupo sham (Fig. 10). La incisión debe cerrarse con hilo quirúrgico. Después de la cirugía, los animales fueron colocados en un área de recuperación, para mantener su temperatura corporal estable, mediante la utilización de lámparas que les proporcionaron calor. Una vez que los animales se recuperaron, fueron colocados nuevamente en sus cajas habitación. Treinta y dos días después de la sección de la arteria carótida izquierda, se realizó el mismo procedimiento con la arteria contralateral. Se utilizaron dos grupos control para el SSACC, un grupo con ratones sin anestesia y sin cirugía (control) y otro grupo con ratones con anestesia y procedimiento quirúrgico, pero sin ligaduras y sección de arterias carótidas (sham).



**Fig. 10.** Procedimiento quirúrgico realizado a los sujetos SSACC Y SHAM. El sujeto es fijado en su tren anterior y superior, así como de sus dientes para restringir sus movimientos durante la cirugía. A: ilustra las arterias carótidas comunes que le ligaron y reaccionaron (Tomado de Alejo-Martínez, 2011).

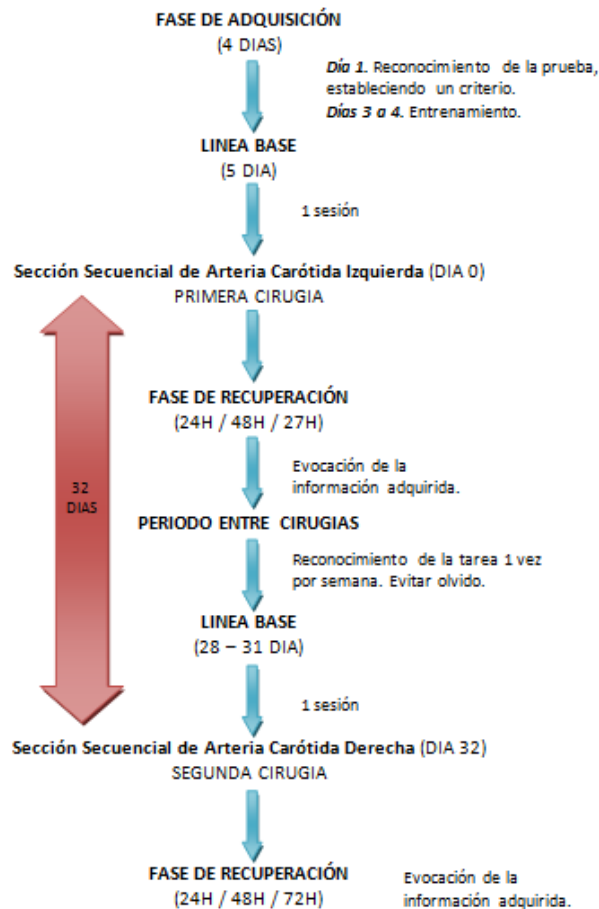
#### 4.7. Criterios de Exclusión.

Se establecieron diferentes criterios de exclusión , el primero de ellos es el trabajo experimental con ratones machos envejecidos (40 – 60 semanas de edad). Al finalizar la fase de adquisición, los animales que no lograran completar la tarea después de 90 segundos (preestablecido en un piloteo previo) serian excluidos de la prueba, sin embargo, todos los animales completaron la prueba en el tiempo establecido durante esta fase. Los animales que no lograran subir a la plataforma después de este tiempo durante la fase de recuperación fueron excluidos de la muestra final para el análisis.

#### 4.8. Procedimiento Experimental.

Los animales sometidos a isquemia cerebral, no solamente sufren de alteraciones cognitivas después del infarto, de la misma manera las alteraciones motoras pueden dificultarles la prueba de nado, por este motivo era esencial encontrar un procedimiento conductual sencillo de recordar y fácil de ejecutar. El laberinto en Y

acuático es una solución óptima, al combinar las ventajas del laberinto acuático de Morris y el laberinto en Y. El procedimiento conductual utilizado en este trabajo está estructurado en tres fases: a) Fase de Adquisición, b) Línea base y c) Fase de Recuperación (Fig. 14). Durante cada una de estas fases el reforzador significativo una plataforma, disponible en el brazo derecho del laberinto acuático.



**Figura 11.** Distribución Temporal de las Fases Experimentales.

Fase de adquisición. Se llevó a cabo durante 4 sesiones continuas por día, con una duración máxima por ensayo de 90 segundos. Durante el día 1 se les permitió a los animales explorar y reconocer el laberinto, la plataforma se fijó desde un inicio en el brazo derecho del laberinto, en un estudio anterior se demostró una tendencia de los animales a ir al brazo izquierdo de manera automática, por esta razón se decidió colocar la plataforma en el brazo contrario para distinguir un comportamiento

automático de un comportamiento aprendido. A los animales se les colocó en el agua a temperatura ambiente, la prueba terminaba cuando el animal lograba subir a la plataforma o superará 90 segundos de nado, en caso de que el animal no completara la tarea después de este tiempo, se le colocaba en la plataforma durante 10 segundos y se repetía el procedimiento. Al finalizar la prueba el animal era secado y puesto en una caja con aserrín junto a un foco para calentarse y secarse. Este procedimiento se repitió durante 3 días más, permitiendo a los animales entrenarse en la tarea y consolidar la ruta correcta para encontrar la plataforma.

Línea base. Al finalizar la fase de adquisición se realizó el registro de una línea base anterior a la primera cirugía de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes (SSACC). El procedimiento conductual en el laberinto es exactamente el mismo que el de la fase de adquisición y la plataforma sigue fija en el brazo derecho. Esta etapa se repite antes de la segunda cirugía.

Fase de recuperación. Después de la primera y segunda cirugía, se evaluó a los animales a las 24, 48 y 72 horas, bajo el mismo procedimiento de la fase de adquisición. El objetivo de esta fase era evaluar la memoria espacial de los animales tras el periodo de cirugías. Por lo que se realizó una comparación en la ejecución de los animales isquémicos con respecto los grupos sham y control, a su vez se realizara una comparación entre los animales expuestos al ambiente enriquecido y los animales no expuestos al mismo.

Periodo entre cirugías. Durante esta etapa que dura un total aproximado de 32 días, a los animales se les mantendrá en las cajas-habitación de ambiente enriquecido. Después de la última evaluación y antes del registro de la segunda línea base, a los animales se les coloca en la prueba del laberinto una vez por semana, esto para evitar el olvido de la prueba.

#### 4.9. Modelo de ambiente enriquecido.

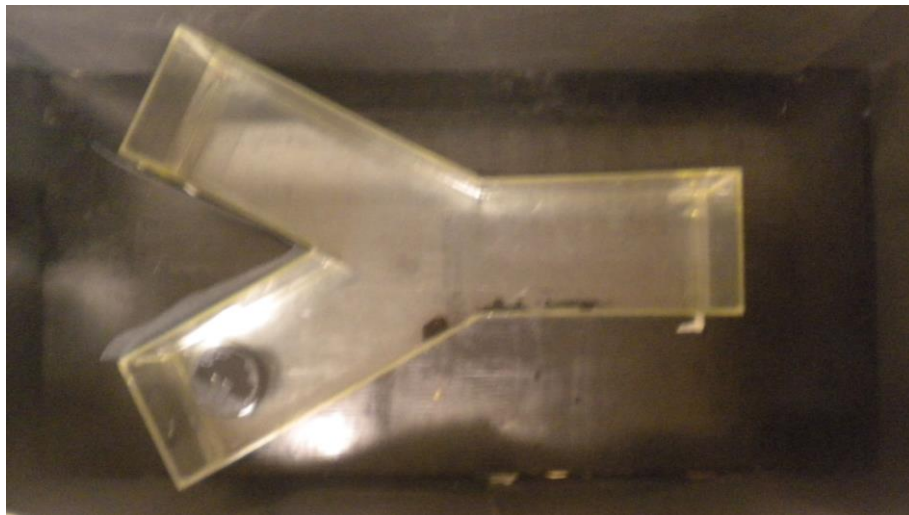
En la fase de adquisición del experimento se colocó a todos los animales en cajas-habitaciones normales, con 3 a 4 animales de la misma camada por caja. Después de la primera cirugía se colocaron 50 animales en las cajas de ambiente enriquecido, en las cuales se les proporcionaron diferentes juguetes de diferentes formas y tamaños, los cuales eran cambiados periódicamente para garantizarles un ambiente novedoso. Además de que estas cajas habitación especial propiciaba la interacción social entre animales, todo con el propósito de investigar el efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos después de ocurridas la cirugías en el modelo SSACC. Se ocuparon 5 cajas habitación de ambientes enriquecidos, revisando la literatura existente, se hizo un promedio aproximado de las dimensiones, con lo cual, cada caja tenía las dimensiones de 15cm x 25cm x55 cm (Fig. 12). Se colocaron 10 ratones por caja de ambiente enriquecido, las cuales ocuparon después de realizada la primera cirugía, hasta terminar el experimento. Los grupos controles a los ambientes enriquecidos (n=50) se colocaron en cajas habitación utilizadas comunes, con 3 a 4 animales por caja, durante todo el experimento. Los animales que presentaban conductas agresivas en las cajas habitación comunes fueron separados de sus compañeros para evitar lesiones entre los animales.



**Fig. 12.** Cajas-habitación para ambientes enriquecidos utilizados durante la realización de experimento. Sus dimensiones son de 15 x 25 x 55 cm, se utilizaron diversos materiales y juguetes para los animales, destacando las ruedas.

#### 4.10. Laberinto en Y acuático.

Para la prueba de memoria se utilizó un laberinto en forma de Y hecho de acrílico (Fabricante independiente) con una altura de 25.5 cm y un ancho de 17 cm, un largo total de 71 cm, en donde cada brazo de la Y tiene un largo de 40.5 cm en la cara externa del laberinto y de 26.5 en la cara interna (Fig. 13). En uno de los brazos se colocó una plataforma de forma cilíndrica con 11 cm de altura y una circunferencia de 28.27 cm, esta plataforma no se movió de lugar durante todas las evaluaciones y fue cubierta con agua a temperatura ambiente. El laberinto se colocó sobre una mesa de madera con una superficie oscura y alrededor se colocaron paredes falsas oscurecidas para evitar cualquier distracción. Además la luz general de la habitación fue apagada y se dejó únicamente encendida una lámpara con luz blanca de 15 watts, con la finalidad de que los animales estén libres de distractores y/o claves ambientales que puedan interferir en el recuerdo de la ubicación de la plataforma y por lo tanto en la ejecución de la tarea.



**Fig. 13.** Laberinto en Y acuático y área de trabajo utilizados para la evaluar la memoria y el aprendizaje de los animales experimentales.

#### 4.11. Análisis estadístico.

Se usó el programa estadístico GraphPad Prism para obtener la curva de supervivencia de los grupos experimentales, se utilizó el método de Kaplan-Meier y se contrastaron con la prueba de rangos logarítmicos para obtener diferencias significativas. Para evaluar el efecto de la cirugía en el aprendizaje y la memoria de los animales, así como del efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos se utilizó un análisis de ANOVA de medidas repetida para hacer comparaciones en los seis grupos y encontrar diferencias significativas. Para la comparación solo de los grupos SSACC se realizó a través de una prueba de t de Student.

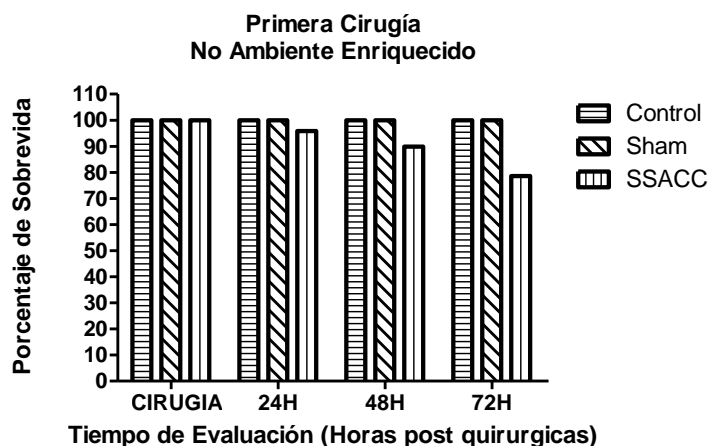


## V. RESULTADOS.

### 5.1. Mortalidad

#### a) Primera cirugía en grupos no expuestos al ambiente enriquecido.

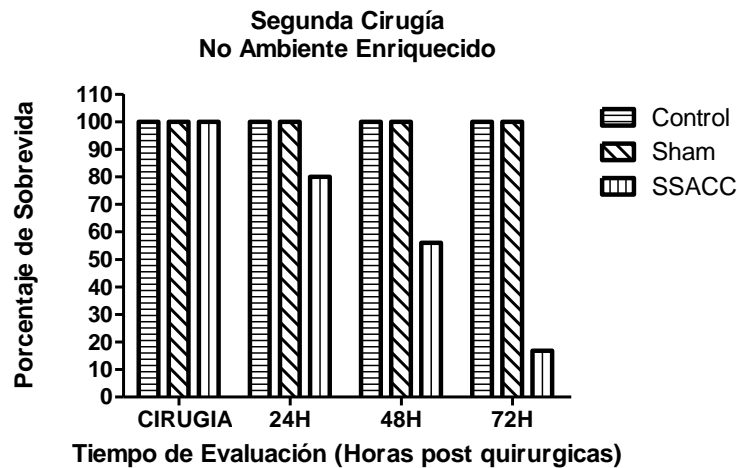
Durante la semana de entrenamiento, no se observó ninguna muerte en el grupo de los animales control. Se registraron dos muertes, una correspondió al grupo sham (n=15) y otra al grupo SSACC (n=25). Al momento de efectuar la primera cirugía, el grupo control tenía una n de 10 animales, el grupo sham una n de 14 y el grupo SSACC una n de 24; este momento se toma como tiempo cero y al no ocurrir ninguna muerte durante las cirugías, el porcentaje de sobrevivencia registrado fue del 100% para todos los grupos (Fig. 14). Durante las observaciones posteriores, a las 24, 48 y 72 horas no se registraron muertes en los grupos control y sham. En el grupo SSACC, a las 24h se registraron dos muertes, que corresponden al 94.66% de sobrevivencia para este grupo a las 48 h fue del 89.84% y para las 72h fue del 78.61%. Usando la prueba de rangos logarítmicos se indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.



**Figura 14.** La gráfica muestra las curvas de sobrevivencia de los tres grupos experimentales no expuestos al ambiente enriquecido, después de la primera cirugía. \*  $p < 0.05$  usando la prueba de rangos logarítmicos.

b) Segunda cirugía en grupos no expuestos al ambiente enriquecido.

En el periodo entre-cirugías después del registro de las 72h, se produjo una muerte experimental para el grupo control, mientras que para los grupos sham y SSACC no se registró ningún deceso. Para la segunda cirugía el grupo control tuvo una n = 9, el sham una n = 14 y el grupo SSACC una n = 20. Se tomo como 100% los animales que llegaron a la segunda cirugía para los tres grupos, no ocurrieron muertes durante el proceso de cirugía, hasta horas posteriores a la misma. El porcentaje de sobrevivida final para los grupos control y sham fue de 100%, ninguna animal murió después del periodo de la segunda cirugía. Mientras tanto el grupo SSACC registro una sobrevivida del 80% a las 24h, el 56% a las 48h y finalmente un 16.80% a las 72h (Fig. 15). Al final de esta fase el grupo control termino con una n de 9 sujetos, el grupo sham con una n de 14 y el grupo SSACC con una n de 6 sujetos. La prueba de rangos logarítmicos demostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

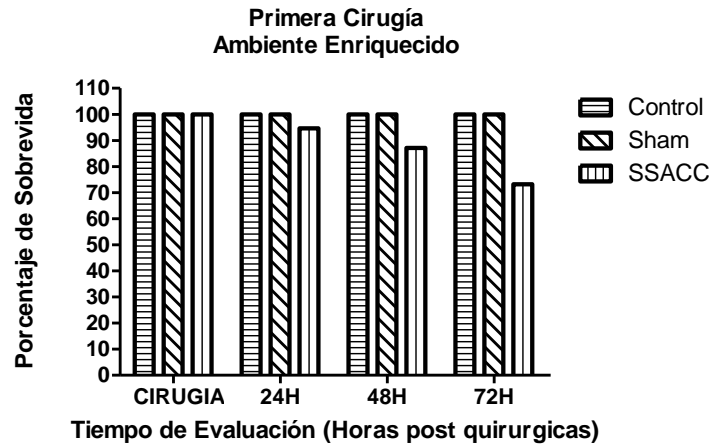


**Figura 15.** La gráfica muestra las curvas de sobrevivida de los tres grupos experimentales no expuestos al ambiente enriquecido después de la segunda cirugía. \*  $p < 0.05$  usando la prueba de rangos logarítmicos.

c) Primera cirugía en grupos expuestos al ambiente enriquecido.

Durante el periodo de entrenamiento no se produjo ninguna muerte en los tres grupos experimentales: expuestos al ambiente enriquecido control (n=10), sham (n=15)

y SSACC (n=25). Para los grupos control y sham el porcentaje de sobrevida se mantuvo intacto durante las posteriores 24, 48 y 72 horas. Mientras que en el transcurso de las primeras 72 horas para el grupo SSACC ocurrieron 4 decesos, con lo que el porcentaje de sobrevida fue de 96.66% a las 24h, el 87.09% a las 48h y el 73.15% a las 72h (Fig. 16). El análisis con la prueba de rangos logarítmicos demostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

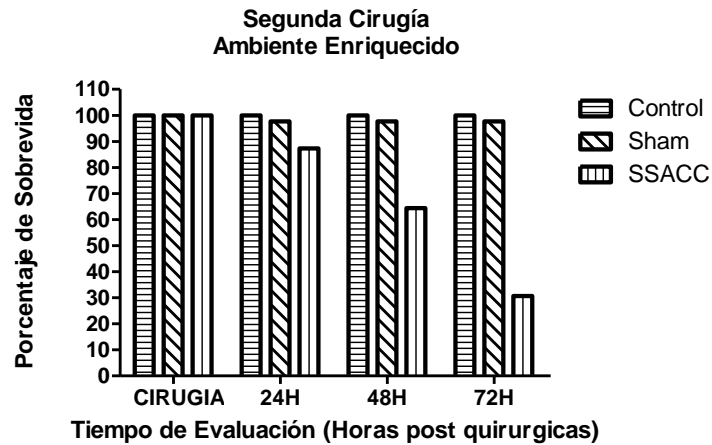


**Figura 16.** La gráfica muestra las curvas de sobrevida de los tres grupos experimentales expuestos al ambiente enriquecido, después de la primera cirugía. \*  $p < 0.05$  usando la prueba de rangos logarítmicos.

d) Segunda cirugía en grupos expuestos al ambiente enriquecido.

En el periodo entre cirugías, no ocurrieron muertes en los tres grupos experimentales. El grupo control llegó con una n de 10 sujetos, el sham con una n de 15 sujetos y el grupo SSACC con una n de 21 sujetos al momento de la segunda cirugía, lo que se tomó como tiempo cero, el porcentaje de sobrevida se contabilizó como el 100%. No ocurrió ninguna muerte experimental en el grupo control en las posteriores 24h, 48h y 72h. Para el grupo sham se produjo solamente una muerte, por lo que el porcentaje de sobrevida fue del 97.77% desde las 24h hasta las 72h. Con algunas muertes para el grupo SSACC el porcentaje de sobrevida a las 24h fue del 85.71%, a las 48h fue del 63.26% y para las 72h el 30.12% (Fig. 17). Al final del experimento el grupo control terminó con una n de 10 sujetos, el grupo sham con una n de 14 sujetos y

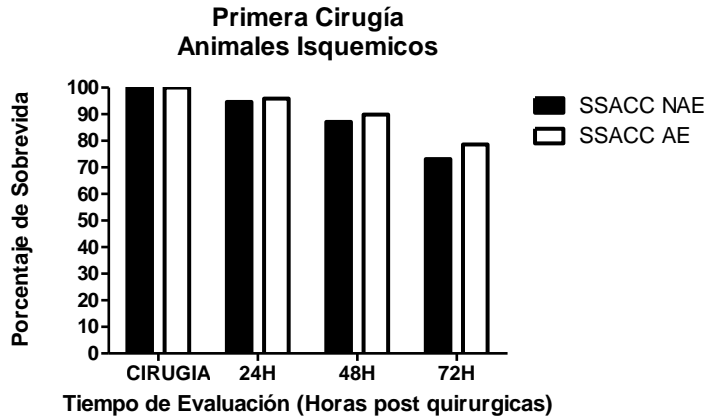
el grupo SSACC con una n de 10 sujetos. La prueba de rangos logarítmicos demostró diferencias significativas entre los grupos.



**Figura 17.** La gráfica muestra las curvas de supervivencia de los tres grupos experimentales expuestos al ambiente enriquecido, después de la segunda cirugía. \*  $p < 0.05$  usando la prueba de rangos logarítmicos.

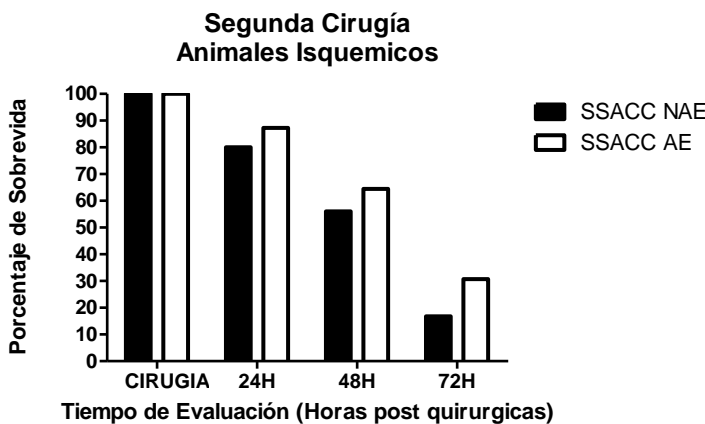
e) Comparación entre grupos isquémicos.

Al hacer un análisis complementario en donde solamente se evaluó la supervivencia de los animales isquémicos durante la primera cirugía, en relación a la variable de ambientes enriquecidos. Para comprobar la existencia de diferencias significativas se utilizó la prueba de rangos logarítmicos, la cual no encontró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el grupo isquémicos expuesto al ambiente enriquecidos y el grupo isquémico no expuestos al ambiente enriquecido; a pesar de esto se observa una mayor supervivencia en los animales expuestos al ambiente enriquecido a las 24, 48 y 72 horas en comparación con los animales no expuestos al ambiente enriquecido (Fig. 18).



**Figura 18.** La gráfica muestra las curvas de sobrevivencia de los grupos isquémicos expuestos en ambas condiciones de ambiente enriquecido después de la primera cirugía. Usando la prueba de rangos logarítmicos no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En lo que respecta a la segunda cirugía, al hacer la comparación de los dos grupos isquémicos en relación a la variable de ambiente enriquecido, tampoco se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al realizar la prueba de rangos logarítmicos. Sin embargo, si se puede observar mayor sobrevivencia en los animales expuestos al ambiente enriquecido, en comparación a los animales no expuestos al ambiente enriquecido, en especial a las 72 horas después de la cirugía (Fig. 19)



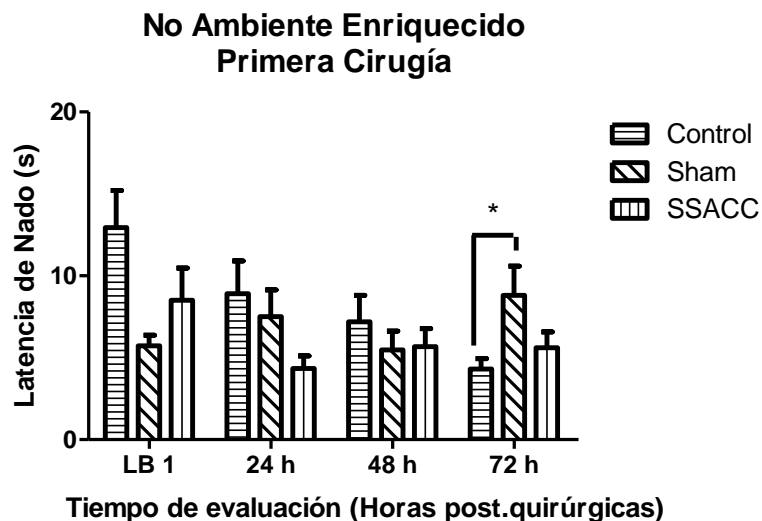
**Figura 19.** La gráfica muestra las curvas de sobrevivencia de los grupos isquémicos expuestos en ambas condiciones de ambiente enriquecido después de la segunda cirugía. Usando la prueba de rangos logarítmicos no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

## 5.2 Latencia de nado.

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas para evaluar los tiempos de ejecución en el laberinto Y acuático, se tomaron en cuenta solo los tiempos de los animales que completaron correctamente la tarea hasta las 72 horas después de la segunda cirugía, excluyéndose los animales muertos durante las evaluaciones y los animales con un daño motor grave. En lo que respecta al ambiente enriquecido, los animales expuestos al mismo conformaron una n total de 34, dividiéndose en: control (n=10), sham (n=14) y SSACC (n=10). Los animales no expuestos al ambiente enriquecido conforman una n total de 29, dividiéndose en: control (n= 9), sham (n=14) y SSACC (n= 6). La n total del grupo control fue de 19, la n del grupo sham 28 y la n del grupo SSACC de 16.

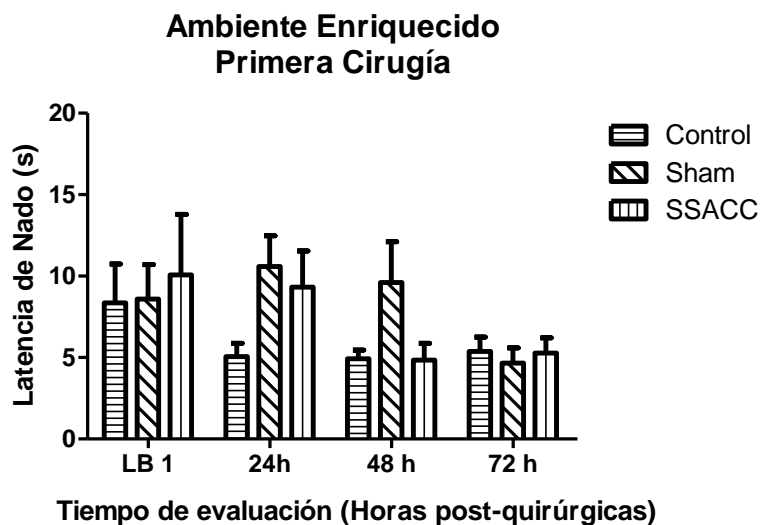
### a) Promedios de la latencia de nado después de primera cirugía

Los datos obtenidos indican que tras la primera cirugía los tiempos del grupo control que no fue expuesto al ambiente enriquecido disminuyeron después del registro basal (12.95 s) a las 24, 48 y 72, registrándose 8.91 s, 7.19 s y 4.30s, respectivamente. Por su parte el grupo sham empezó con un registro basal más bajo que el grupo control con 5.73 s, pero su desempeño durante las 24, 48 y 72 horas posteriores, mostro un patrón muy irregular, registrándose 7.50 s, 5.48 s y 8.81 s. En el caso del grupo isquémico, tiene un registro basal más bajo que el grupo control, pero más alto que el grupo sham (8.51 s). Durante las 24, 48 y 72 horas los tiempos se estabilizaron y bajaron en comparación al tiempo basal con 4.34 s, 5.68 s y 5.61 s, respectivamente (Fig. 18). Al comparar los grupos con una prueba de ANOVA de medidas repetidas solo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 48 horas en el grupo control y sham (Fig. 20).



**Figura 20.** Promedio de la latencia ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la primera cirugía en los animales que no fueron expuestos al ambiente enriquecido. Se encuentran diferencias significativas al realizar un ANOVA de medidas repetidas ( $p < 0.05$ ), entre grupos control y sham a las 72 horas.

En lo que respecta a los grupos expuestos a ambientes enriquecidos, la condición control presentó una disminución las 24 y 48 horas, con respecto a la línea base de 8.35 s, se registró un promedio de 5.06 s y 4.93 s respectivamente, mientras que a las 72 horas se observó un pequeño incremento de 5.38 s. El grupo sham comenzó con una línea base muy similar al grupo control (8.59 s), a las 24 horas ocurrió un incremento considerado de 10.59 s, mientras que a las 48 y 72 horas se registro un decremento de 9.60 y 4.66 respectivamente. Por último el grupo isquémico tiene una línea base mayor a los grupos control y sham (10.07 s), a las 24 y 48 horas se registro un decremento de 9.33 y 4.85 respectivamente, mientras que a las 72 horas el promedio experimento un leve ascenso de 5.28 s (Fig. 21). No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) durante esta evaluación a través de la prueba de ANOVA de medidas repetidas.



**Figura 21.** Promedio de la latencia ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la primera cirugía de los animales que expuestos al ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al utilizar un ANOVA de medidas repetidas.

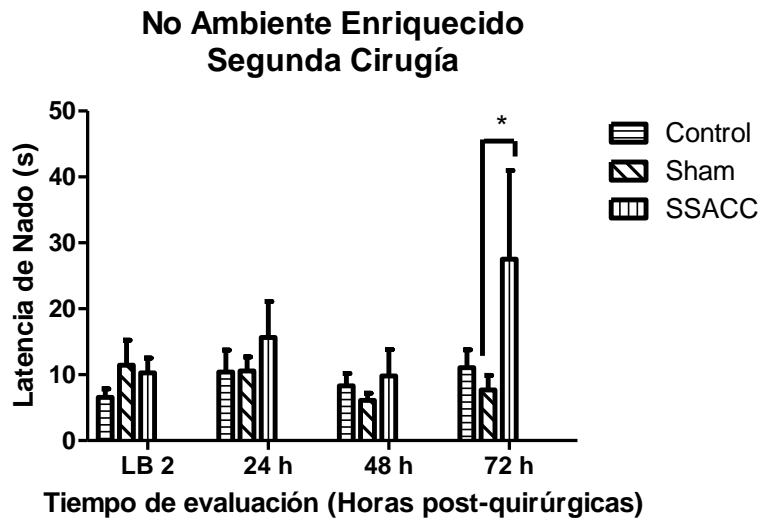
b) Promedios de la latencia de nado después de la segunda cirugía.

Después de 32 días d realizada la primera cirugía, se realizó la sección secuencial de la arteria carótida derecha. En el periodo entre cirugías, después de la evaluación de 72 horas, se sometió a los animales a un ensayo por semana para evitar el olvido de la tarea. Antes de realizarse esta cirugía se registró una línea base en todos los grupos y las correspondientes evaluaciones a las 24, 48 y 72 posteriores.

Los animales no expuestos a los ambientes enriquecidos del grupo control mostraron un promedio de línea base considerablemente menor (6.58 s) a la primera. Sin embargo, las evaluaciones de las 24, 48 y 72 horas reflejan considerables ascensos de una manera irregular, registrándose 10.41 s, 8.31 s y 11.06 s. El grupo sham mostro un asenso en su segunda línea base (11.42 s), para las 24 y 48 horas se registró un descenso de 10.56 s y 6.11 s, respectivamente, mientras que las 72 horas se observo un ligero ascenso de 7.69 s. Por último, el grupo SSACC también registra un ascenso

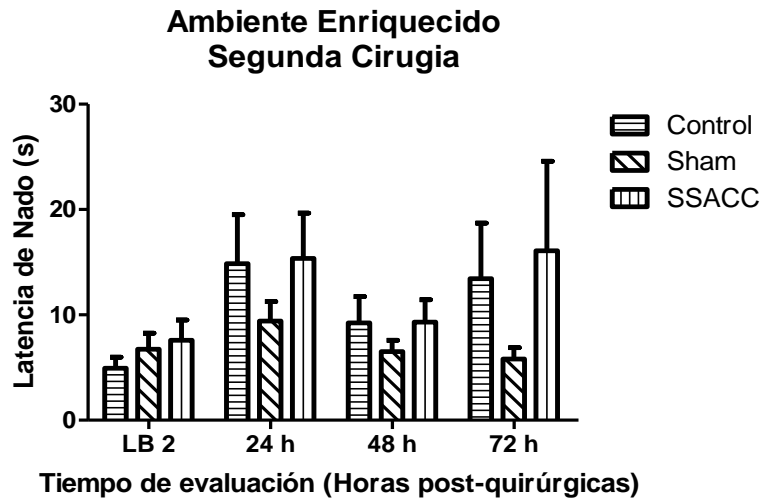


en su segunda línea base (10.29 s), en el registro de las 24, 48 y 72 horas ocurren ascensos de 15.64 s, 9.38 s y 27.53 s, respectivamente (Fig. 22)



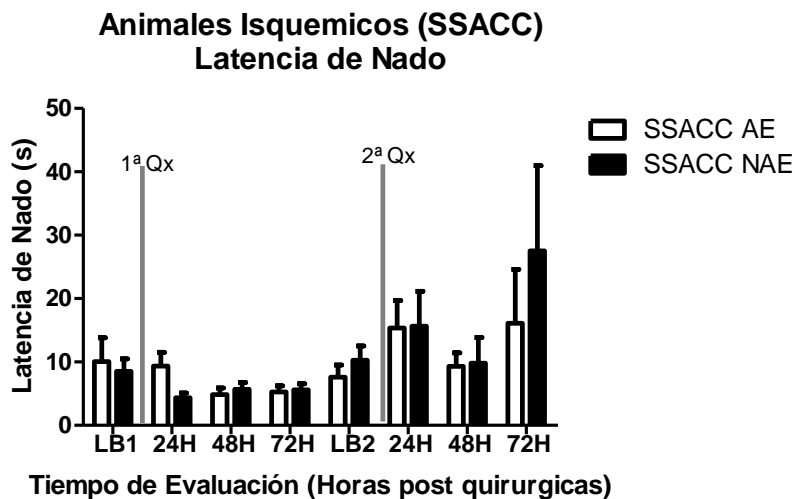
**Figura 22.** Promedio de la latencia ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la segunda cirugía de los animales que no fueron expuestos al ambiente enriquecido. Se encuentran diferencias significativas al realizar un ANOVA de medidas repetidas ( $p < 0.05$ ), entre grupos SACC y sham a las 72 horas.

Los animales expuestos al ambiente enriquecidos del grupo control registró un descenso en su línea base (4.94 s) con respecto a la primera. Los tiempos de las 24, 48 y 72 horas son desiguales, primeramente ocurrió un pico pronunciado a las 24 horas (14.85 s), con un descenso a las 48 horas (9.24 s) y otro aumento a las 72 horas (13.43 s). El grupo sham, al igual que el grupo control registro una segunda línea base menor (6.74 s), a las 24 horas se ocurrió un leve aumento de 9.41 s; mientras que se presentaron descensos a las 48 y 72 horas de 6.52 s y 5.80 s, respectivamente. El grupo SSACC se comporto de una manera similar, registrándose un descenso en su segunda línea base (7.59 s), a las 24 horas aumentaron los tiempos considerable (15.36 s), seguido de un descenso a las 48 horas (9.30 s) y a las 72 otro aumento a las 72 horas de 16.09 S (Fig. 23).



**Figura 23.** Promedio de la latencia ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la segunda cirugía de los animales que expuestos al ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al utilizar un ANOVA de medidas repetidas.

Se muestra una tendencia de los animales isquémicos en ambiente enriquecido a tener latencias de nado más bajas en comparación al grupo no expuesto después de la segunda cirugía, la comparación entre pares del ANOVA de medidas repetidas no muestra diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las condiciones de ambiente enriquecido (Fig. 24).



**Figura 24.** Promedio de la latencia de nado ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado de los animales isquémicos, con respecto a la condición de ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al utilizar un ANOVA de medidas repetidas.

Al realizar un ANOVA de medidas repetidas, el supuesto de esfericidad no se cumple, sin embargo, al utilizar el corrector de Greenhouse-Geisser obtenemos lo siguiente:

**Tabla 1.** Prueba F del ANOVA de medidas repetidas de las latencias de nado.

	F	Sig
TIEMPO	6.166	0.000
TIEMPO * GRUPO	4.43	0.020
TIEMPO * AE	0.650	0.608
TIEMPO * GRUPO * AE	1.026	0.414

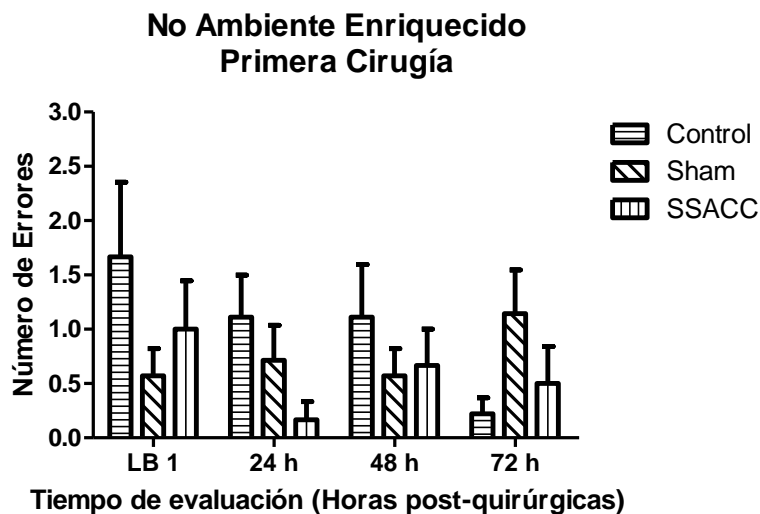
Con los anteriores resultados demostramos que el factor tiempo (medidas repetidas) y grupo (condición experimental), representan diferencias significativas a diferencia de la interacción con el ambiente enriquecido donde no se puede demostrar diferencias significativas. Al hacer la comparación múltiples Tiempo \* Grupo \* AE encontramos diferencias significativas en los animales no expuestos al ambiente enriquecido de los grupos control y sham a las 72 horas después de la primera cirugía ( $p=0.03$ ), igualmente a las 72 horas después de la segunda cirugía en los grupos SSACC Y sham ( $p=0.05$ ). Mientras que los grupos sometidos al ambiente enriquecido no hay diferencias significativas entre todos los grupos en ninguna evaluación. Por consiguiente el ambiente enriquecido actúa en el impacto del grupo SSACC.

### 5.3 Errores de ejecución.

Tras los resultados obtenidos en la cuantificación y análisis de las latencias, se determinó complementar el estudio analizando el número de errores cometidos por los animales durante cada una de las evaluaciones. Para esto se revisó cada uno de los videos y se considero error cualquier desplazamiento al brazo contrario de la posición de la plataforma, así como un desplazamiento al brazo de salida o la entrada al brazo correcto pero sin llegar a la plataforma. Solo se consideró como acierto, la llegada al brazo correcto y el ascenso del animal a la plataforma (o ya sea el caso que pueda recargarse en ella, en los animales con un daño motor extremo tras la isquemia).

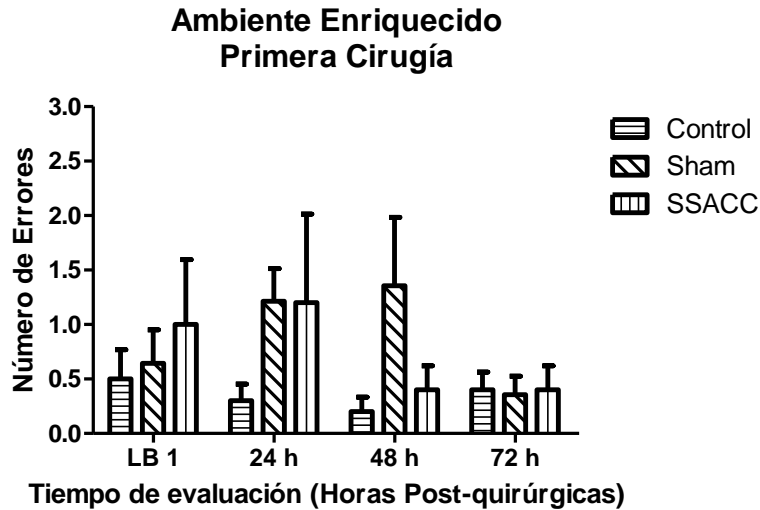
a) Promedios de errores de ejecución después de la primera cirugía.

Los animales control no expuestos a ambiente enriquecido mostraron una reducción en los promedios de sus ejecuciones a las 24 (1.11), 48 (1.11) y 72 (0.22) horas, con respecto a su línea base (1.66). El grupo sham obtuvo un promedio de 0.57 errores en su línea base, un ligero aumento a las 24 horas (0.71), un descenso a las 48 horas (0.57) y otro ascenso pronunciado a las 72 horas (1.14). El grupo isquémico, presento una línea base promedio de 1.00 errores, un descenso de 0.16 a las 24 horas, un aumento de 0.66 a las 48 horas y descenso de 0.55 a las 72 horas (Fig. 25).



**Figura 25.** Promedio del número de errores de ejecución ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la primera cirugía de los animales que no fueron expuestos al ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al realizar un ANOVA de medidas repetidas.

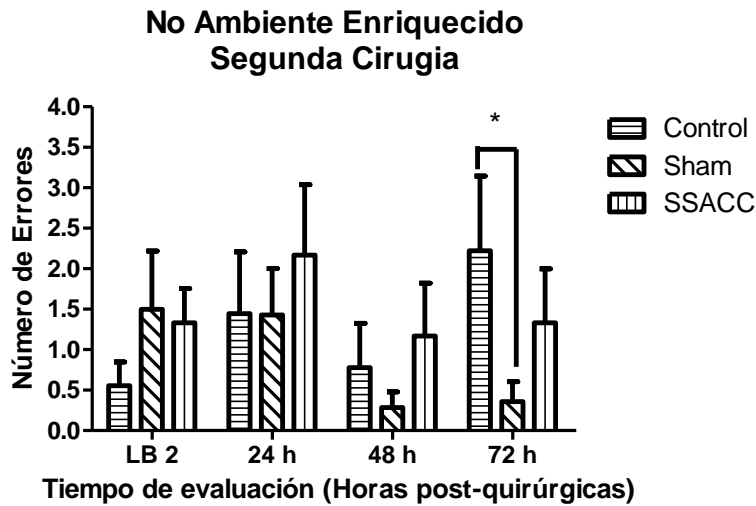
Los animales expuestos al ambiente enriquecido del grupo control obtuvieron un promedio de línea base de 0.50 errores, mientras que a las 24 y 48 horas mostraron descensos de 0.30 y 0.20 respectivamente, a las 72 horas se registró un aumento de 0.40. El grupo sham mostro un comportamiento irregular, registrando una línea base de 0.64, mientras que a las 24 y 48 horas se registran dos aumentos pronunciados de 1.21 y 1.35, seguido de un descenso a las 72 horas de 0.35. Por último el grupo SSACC presenta una línea base de 1.00, mientras que a las 24 horas registra un aumento de 1.20, con un descenso a las 48 y 72 horas de 0.40 para ambos (Fig. 26).



**Figura 26.** Promedio del número del número errores de ejecución ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la primera cirugía de los animales expuestos al ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al realizar un ANOVA de medidas repetidas.

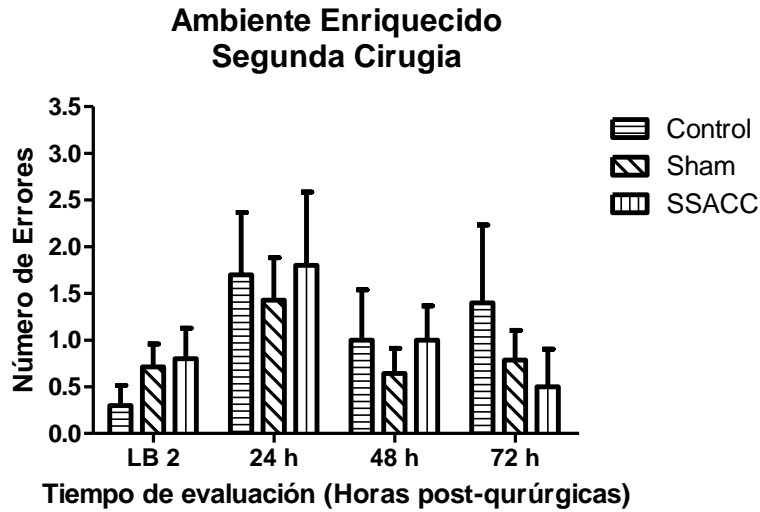
b) Promedios de errores de ejecución después de la Segunda cirugía.

Los promedios en los errores de los animales controles no expuesto a ambiente enriquecido después de la segunda cirugía son los siguientes: 0.55 para la línea base, 1.44 a las 24 horas, 0.77 a las 48 horas y 2.22 a las 72 horas, notándose un aumento considerable a las 72 horas y una segunda línea base inferior a la primera. Por su parte, el grupo sham mostró una línea base considerablemente mayor a la primera registrando 1.50, seguida de descensos a las 24 y 48 horas de 1.42 y 0.28, además de un aumento a las 72 horas de 0.35. Por último, el grupo SSACC registro una línea base mayor (1.33) en relación a la primera, además de un aumento a las 24 horas de 2.16, un descenso a las horas de 1.16 y un nuevo ascenso a las 72 horas de 1.33 (Fig. 24).



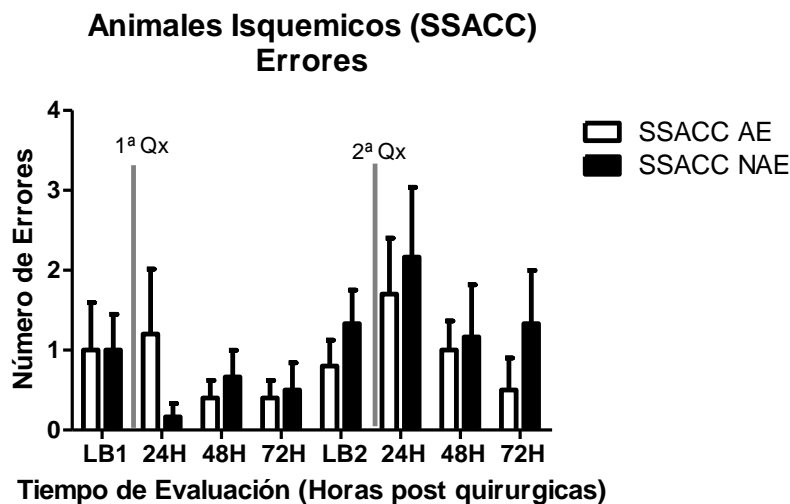
**Figura 27.** Promedio del número de errores de ejecución ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la segunda cirugía de los animales que no fueron expuestos al ambiente enriquecido. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y sham a las 72 horas, usando un ANOVA de medidas repetidas.

Los animales expuestos al ambiente enriquecido, el grupo control mostraron una línea base menor (0.30), con respecto a la primera línea base, un ascenso pronunciado a las 24 horas de 1.70, un descenso de 1.00 a las 48 horas y un aumento de 1.40 a las 72 horas. El grupo sham con una segunda línea base de 0.71, presenta un aumento de 1.42 a las 24 horas, un descenso a las 48 horas de 0.64 y un aumento a las 72 horas de 0.78. El grupo SSACC muestra un descenso en su segunda línea base de 0.80, además de un aumento a las 24 horas (1.80) y descensos a las 48 y 72 horas, registrándose 1.00 y 0.88 (Fig. 28).



**Figura 28.** Promedio de los errores de ejecución ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado después de la segunda cirugía de los animales expuestos al ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al analizarlo a través de un ANOVA de medidas repetidas.

Se observa una disminución en el número de errores cometidos de los animales isquémicos expuestos al ambiente enriquecido en comparación a los animales isquémicos no expuestos a estos (Fig. 29), sin embargo, el análisis estadístico no encuentra diferencias significativas entre las condiciones experimentales ( $p > 0.05$ ).



**Figura 29.** Promedio de los errores de ejecución ( $\pm$  error estándar) observado en la prueba de nado de los animales isquémicos con respecto a la variable de ambiente enriquecido. No hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), al analizarlo a través de un ANOVA de medidas repetidas.

Al realizar un ANOVA de medidas repetidas, el supuesto de esfericidad no se cumple, sin embargo, al utilizar el corrector de Greenhouse-Geisser obtenemos lo siguiente:

**Tabla 2.** Prueba F del ANOVA de medidas repetidas del promedio de los errores.

	F	Sig
TIEMPO	3.029	0.009
TIEMPO * GRUPO	1.209	0.280
TIEMPO * AE	0.464	0.819
TIEMPO * GRUPO * AE	0.859	0.580

Con los resultados anteriores se observa significancia solo el factor tiempo. Al hacer la comparación múltiples Tiempo \* Grupo \* AE solo encontramos diferencias significativas en los grupos control y sham a las 72 horas después de la segunda cirugía ( $p=0.05$ ). Mientras que en los grupos sometidos al ambiente enriquecido no hay diferencias significativas entre todos los grupos en ninguna evaluación. Por consiguiente el ambiente enriquecido actúa en el impacto del grupo SSACC.



## VI. DISCUSIÓN.

El modelo SSACC es un modelo de isquemia cerebral global incompleto de hipoperfusión, debido a que la oclusión de ambas carótidas ocurre en un periodo de 32 días entre una y otra, lo que posibilita la simulación de lo que ocurre en la clínica con los pacientes. Igualmente el periodo de 32 días entre cirugías posibilita al sistema vascular cerebral realizar procesos de compensación, como el aumento del diámetro de las arterias o angiogénesis. Uno de nuestros objetivos era identificar el efecto de la isquemia cerebral aguda provocada por SSACC en las afectaciones de la memoria y el aprendizaje. Como se esperaba, después de la segunda cirugía, los animales sometidos a la SSACC presentaron una serie de alteraciones anteriormente descritas como temblores, encorvamiento, marcha atáxica, entre otras (Rodríguez et al., 2005). Sin embargo la incoordinación motora es una de las más evidentes y que resaltan al momento de evaluar a los animales en el laberinto en Y acuático. Cabe recordar que los laberintos acuáticos son uno de los modelos más empleados para evaluar el daño de la memoria espacial y actividad motora en los animales experimentales, en estos modelos los animales tienen que nadar para encontrar una plataforma, lo que lo diferencia de otros modelos en los que necesita privación de alimento y agua o choques eléctricos para motivar la conducta. Los laberintos acuáticos han demostrado ser una prueba rápida y sensible al aprendizaje espacial (Nelson, Lebissi, Sowinski y Hodges, 1997; Vincens, Redolat y Carrasco, 2003).

Como se comprobó anteriormente el modelo SSACC provoca alteraciones motoras en la conducta de nado de los animales isquémicos en comparación con los grupos controles (Delgado-García, 2009); igualmente se ha observado que durante el primer contacto con el agua (que es un estímulo aversivo para los roedores), los animales despliegan una serie de comportamientos que reflejan el estrés causado por la tarea, tales como saltar, rascar, nadar cerca de las paredes, nadar en círculos, etc.; y que en conjunto representan la búsqueda de una estrategia efectiva para salir del agua (Delgado García, 2009). Todo esto provoca que los animales isquémicos tengan varias dificultades para completar las tareas en los laberintos acuáticos, incluyendo el laberinto

acuático en Y, el cual resulto ser útil para la evaluación de las alteraciones en el aprendizaje y la memoria de los animales sometidos a la SSACC.

El objetivo general del trabajo era identificar el efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en las alteraciones del aprendizaje y la memoria inducidas por isquemia cerebral aguda. Los resultados obtenidos muestran mejores ejecuciones en el laberinto acuático en Y de los animales isquémicos expuestos al ambiente enriquecido, aunque estos no resultan ser significativos. Estudios previos que utilizaron ambientes enriquecidos para evaluar a los animales experimentales encontraron la presencia de células madre neuronales que pueden dar como resultado en menor medida la neurogenesis en los centros CA1 del hipocampo semanas después de las cirugías, pero en su mayoría estas nuevas células son astrocitos y oligodendrocitos que ayudan en la sinaptogenesis y plasticidad cerebral, que a su vez ayuda en la compensación de la perdida de la función motora y/o cognitiva (Belayev et. al., 2003; Nithianantharajah, J. y Hannan, 2006; Shono et al., 2011). La acción benéfica del enriquecimiento ambiental depende del tiempo de exposición a los ambientes enriquecidos después de un infarto, el tipo de obstrucción sanguínea al que sean sometidos los animales experimentales, la especie de los animales experimentales y la edad de los mismos (Belayev et al., 2003; Saucier, 2007; Silva et al., 2011). Estudios previos han encontrado un mejor efecto del enriquecimiento en los animales experimentales ocho semanas antes o después de la obstrucción sanguínea y de igual manera, resultandos más positivos en el comportamiento de los animales en una población joven a comparación de una población envejecida (Belayev et al., 2003; Saucier, 2007).

El modelo SSACC trabaja con un intervalo de 32 días entre cirugías y el presente trabajo trato de simular lo que pasa en la clínica al introducir el enriquecimiento cuando los primeros síntomas de microinfartos aparecen (correspondiente a los primeros días después de la primera cirugía), con ello se intentó frenar el impacto de las alteraciones conductuales y cognitivas cuando ocurrió la isquemia aguda global (correspondiente a la ligadura de la segunda arteria carótida). De la misma manera, los animales estuvieron en las cajas habitación enriquecidas solamente 72 horas posteriores a la segunda cirugía, esto debido por un lado al tiempo de evaluación establecido para la

fase de retención y también a la alta tasa de mortalidad que se registra en el modelo después de la segunda ligadura (Fuentes-Vargas, 2002; Delgado-Garcia, 2009; Alejo-Martinez, 2011).

Algunos investigadores han concluido que en los laberintos acuáticos los animales requiere relativamente pocos ensayos, debido a que basan su búsqueda en movimiento aprendidos durante la ejecución de la tarea, lo que les permite hacer asociaciones entre estímulos y la meta (Vincens, Redolat y Carrasco, 2003); sin embargo, también se ha reportado que existen discrepancias entre los diferentes laboratorios (así mismo con entre los diferentes modelos de laberintos) que aparentemente miden los mismos procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, estas las diferencias radican en la adquisición pre y/o post operatoria de la tarea a ejecutar (Nelson, Lebissi, Sowinski & Hodges, 1997). Uno de los objetivos era encontrar las alteraciones causadas por la isquemia cerebral aguda en el aprendizaje y memoria de los animales, por esta razón la tarea fue aprendida con anterioridad a la cirugía, lo cual permitió medir el nivel de recuerdo en cada evaluación y también observar el cambio perdurable en las respuestas.

a) Efectos inducidos por la primera cirugía.

En lo que respecta a la primera cirugía, los animales del grupo isquémico (SSACC) y control mantuvieron una disminución en los promedios de sus latencias de nado en comparación a su línea base, mientras que el grupo sham se comportó de manera distinta, observándose aumentos y descensos en los animales no expuestos al ambiente enriquecido (Fig. 20) y aumentos a las 24 y 48 horas después de la segunda cirugía en los animales expuestos al ambientes enriquecidos (Fig. 21). Los animales isquémicos expuestos al ambiente enriquecido registran latencias ligeramente mayores durante las primeras 24 y 48 horas, en comparación a los animales isquémicos no expuestos (Fig. 24). Estudios con animales en cajas – habitación de ambiente enriquecido demuestran una hiperactividad durante las primeras horas o días, la cual se va normalizando conforme avanza el tiempo (Cramer & Nudo, 2010). Igualmente debemos recordar que ocurren mecanismos adaptativos y compensatorios en el

sistema vascular cerebral, después del corte de la carótida izquierda (Rodríguez et al, 2000). Todo esto podría explicar los ligeros aumentos y progresivos descensos en los grupos expuestos al ambiente enriquecidos frente a los que no lo están, además de promedios prácticamente iguales entre los grupos experimentales

Los resultados obtenidos durante las evaluaciones posteriores a la primera cirugía, son similares a los obtenidos en experimentos previos realizados por Delgado García (2009) y McAuliffe, Miles & Vorhee (2006), en donde los tiempos en las latencias de los animales disminuyen durante los días de prueba en el grupo control y el grupo lesionado (McAuliffe, Miles y Vorhee 2006), además de encontrar un aumento a las 24 horas en los grupos expuestos a la cirugía, seguidos por una tendencia a la baja durante las 48 y 72 horas posteriores al procedimiento (Delgado Garcia, 2009).

En lo que respecta al porcentaje de sobrevivencia, no se reportan muertes en los grupos Control y Sham durante el periodo de evaluación de la primera cirugía, mientras que en el grupo SSACC se reporta un porcentaje final de 78.61 para el grupo no expuesto al ambiente enriquecidos y 73.15% para el grupo expuesto al ambiente enriquecidos. Los resultados obtenidos en la prueba del laberinto acuático en Y, además de los porcentajes de sobrevivencia son consistentes con los obtenidos en la clínica, en donde la oclusión de la primera carótida no produce alteraciones permanentes en la ejecución de tareas, representando un evento isquémico previo a un evento global posterior, que pasan desapercibido para la mayoría de los pacientes que presentan eventos isquémicos agudos (Chalela, Merino y Warach, 2004).

b) Efectos inducidos por la segunda cirugía.

Las evaluaciones posteriores a la segunda cirugía, al igual que la línea base previa, son de vital importancia, debido a que durante este periodo se manifiestan los síntomas de la isquemia cerebral aguda. Mientras que en la primera cirugía se manifiestan los primeros síntomas posteriores a un primer microinfarto, la sección de la carótida derecha desencadena todas las alteraciones neuroconductuales propias de la isquemia cerebral aguda (Rodríguez, et al., 2000). Los estudios en laberintos acuáticos han observado un daño en la formación hipocampal, principalmente en la fimbria y el

fornix (Whishaw, 1995) lo cual puede producir un daño en el aprendizaje y la memoria, además de la inhabilidad de controlar los movimientos de las extremidades, lo que repercute en la latencia y la distancia de nado.

En la segunda línea base los promedios de las latencias y los números de errores de los animales controles e isquémicos son menores en comparación a la línea base antes de la primera cirugía; por su parte el grupo sham no expuesto al ambiente enriquecido muestra aumentos en las líneas bases tanto de sus latencias como de sus errores, algo similar a lo que encontró Delgado-Gracia (2009).

Como se esperaba, el grupo isquémico resulta ser el más afectado en la ejecución de la tarea horas después de la cirugía segunda cirugía, tal y como lo reportaron otros trabajos (Fuentes Vargas, 2002; Delgado-García, 2009; Alejo-Martínez, 2011). Evidencias generadas por otros grupos de trabajo señalan que los ratones con isquemia inducida por la oclusión de la arteria cerebral media izquierda, presentan diversos déficits en la prueba del laberinto de Morris, por lo tanto tardan más tiempo en encontrar la plataforma que el grupo Sham y tienden a regresar al punto de inicio (Winter, Bert, Drnagl y Endres, 2004). No solamente se ha comprobado alteraciones de tipo motor grueso (Delgado-Garcia, 2009) o motor fino (Gómez et. al., 2006), Zoladek y Roberts (1976, citados en Klapdor, 1996) Tras la isquemia cerebral se han encontrado ubicaron un aumento en el nadodirecto y por lo tanto un incrementos en la distancia recorrida, los cuales pueden estar relacionados con la debilidad sensorial visual que provoca la isquemia cerebral (Zoladek y Roberts, 1976, citados en Klapdor, 1996; Block y Schwarz, 1996; McAuliffe, Miles y Vorhee, 2006)

Las latencias de nado de los animales isquémicos en ambas condiciones de ambiente enriquecido presentan promedios mayores con respecto al grupo control, especialmente a las 72 horas efectuada la cirugía, a pesar de excluir a los animales cuyas alteraciones motoras y/o visuales les impidió completar la tarea del laberinto acuático en Y, los animales que utilizados para el análisis aun presentaron alteraciones en la conducta de nado, debido a que la función motora no se reestablece a su

totalidad, solamente se puede compensar la motricidad afectada en los animales isquémicos (Kierling, 2009).

Mientras que el promedio de los errores parece ser un mejor indicador para medir la memoria en los animales isquémicos, como se esperaba, a pesar de no encontrar diferencias significativas, los promedios en los errores de los animales expuestos al ambiente enriquecido son mejores que los animales isquémicos en condiciones sin enriquecimiento (Fig. 29). Esto podría sugerir que los ambientes enriquecidos fomentan la neuroprotección hipocámpal y la plasticidad de los circuitos neuronales, así como mecanismos compensatorios que ayuden a atenuar las deficiencias cognitivas, como se ha estudiado en los laberintos acuáticos de Morris (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Reynolds, Lane y Richards, 2010; Shono et al., 2011; Cramer y Nudo, 2010). Sin embargo, no es algo que se pueda comprobar en esta investigación debido a las muestras con *n* pequeñas y al poco tiempo de exposición a los ambientes enriquecidos después de la segunda cirugía.

Los grupos controles a la condición isquémica muestran aumentos en sus tiempos durante la segunda cirugía. La tendencia del grupo control al presentar valores elevados puede sugerir un proceso de habituación al ambiente experimental ya que como Kikusui, Tonohiro y Kaneko (1999) señala, cuando los animales aprenden a resolver la tarea, el ambiente experimental se vuelve familiar, incluso la aversión al agua se vuelve familiar, hecho que provoca una reducción en su estrés y una ejecución calmada o lenta.

En lo que respecta al porcentaje de supervivencia, los grupos Control y sham no mostraron muertes durante este periodo de tiempo, mientras que el grupo control registro tan solo un 16.80 % de supervivencia lo que se traduce a 6 animales. Por su parte en los grupos expuestos al ambiente enriquecido, el grupo control no mostro ninguna muerte, el grupo Sham mostro descensos que se traducen en 88.21%, mientras que el grupo SSACC muestra un porcentaje de supervivencia final del 30.12%, que considerablemente mayor al porcentaje de animales SSACC que no estuvieron

expuestos a la variable de ambiente enriquecido (16.80%), a pesar de esto los resultados no son significativos (Fig. 19).

## VII. CONCLUSIONES.

El objetivo del presente trabajo fue identificar el potencial efecto neuroprotector de los ambientes enriquecidos en las alteraciones del aprendizaje y la memoria inducidos por isquemia cerebral aguda. Los estudios en isquemia cerebral aguda de tipo global como el modelo SSACC son escasos, incluyendo los estudios del aprendizaje y memoria en este tipo de modelos con ratones, este trabajo es uno de los primero en proponer el uso de ambientes enriquecidos como neuroprotector en el modelo SSACC. Los resultados obtenidos nos permiten decir:

1. La isquemia cerebral global inducida por SSACC, después de la segunda cirugía genera alteraciones en el aprendizaje y la memoria de la prueba de laberinto en Y acuático en los animales sometidos a isquemia cerebral. El promedio de los errores de ejecución parece ser un mejor indicador para observar el deterioro en el aprendizaje y la memoria de los animales isquémicos.
2. No hay diferencias significativas que demuestren la neuroprotección del aprendizaje y la memoria a través de la utilización de ambientes enriquecidos en el modelo de Sección Secuencial de Aterías Carótidas Comunes.
3. La sobrevivencia de los animales isquémicos es mayor en los animales expuestos al ambiente enriquecido en comparación a los que no lo estuvieron. La ausencia de diferencias significativas no permite concluir el efecto de los ambientes enriquecidos en la sobrevivencia de los animales.
4. Los ambientes enriquecidos han sido descritos en diferentes estudios como una alternativa terapéutica viable para los pacientes que han sufrido alguna alteración cerebral, incluida la isquemia cerebral. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, a pesar de encontrar mejorías en los animales

isquémicos, no se encontraron diferencias significativas que permitan identificar un efecto contundente de los ambientes enriquecidos como neuroprotector en el modelo de sección secuencial de arterias carótidas.

Entre los problemas y sugerencias encontrados en el presente trabajo podemos citar:

1. Un aumento significativo en los sujetos experimentales para que los resultados puedan tener una mayor significancia, permita reducir el error estándar
2. Un periodo de adquisición y entrenamiento más prolongado, que puede consistir en más de una sesión de entrenamiento por día, lo que permitirá que los animales al momento de llegar a la primera línea base dominen completamente la prueba del laberinto en Y, reduciendo la probabilidad de que uno o varios animales aumenten significativamente los puntajes de los grupos.
3. Reducir el espacio en las paredes del laberinto en Y, debido que al tener un espacio bastante amplio los animales tienen a producir más estrés en especial los animales isquémicos. La reducción de las paredes les puede beneficiar con un nado más directo.
4. Acompañar la prueba de memoria con una prueba motora en seco para poder detectar mejor a los animales imposibilitados para realizar la tarea, descartarlos y con ello mejorar los promedios de los grupos isquémicos.



## VII. REFERENCIAS.

- Alcalá, R. J. y González G. R. (2007). Enfermedad Cerebrovascular, epidemiología y prevención [Monografía]. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 50, pp. 36-39.
- 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.
- America Stroke Association (2008). Heart Disease and Stroke Statistics – 2008 Update. Dallas: American Heart Association.
- Arango-Dávila, C., Escobar-Bentancourt, M., Cardona-Gomez, G. P y Pimienta-Jimenez, H. (2004). Fisiopatología de la isquemia Cerebral Focal: Aspectos Básicos y Proyección a la clínica. *Revista Neurológica*, 39 (2), pp. 156 – 165.
- Arauz, A. y Ruíz-Franco A. (2012). Artículo de Revisión: Enfermedad Vasular Cerebral. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, Vol. 55 (3), pp. 11- 21.
- Back, T., Hemmen, T. y Schüler, O. (2004). Lesion evolution in cerebral ischemia. *Journal of Neurology*, 251, pp. 388-397.
- Bear, M. F. (2008). *Neurociencia: La Exploración del Cerebro*. Barcelona : Wolters Kluwer Health / Lippincott / Williams & Wilkins
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L.y Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and developmet of a neurologic examination. *Stroke*, 17, pp. 472 – 476.
- Belayev, L. C., Zhao, W., Busto. R. y Ginsberg, M. D. (1997). Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture, I: three-dimensional autoradio-graphic image-analysis of foal cerebral metabolism blood flow interrelationships during ischemiaand early recirculation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17, 1266 – 1280.
- Belayev, A., Saul, I., Liu, Y., Zhao, W., Ginsberg, M. D., Valdes, M. A., Bustos, R. y Belayev, L. (2003). Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 954, pp. 121 – 127.

- Block, F. y Schwarz M. (1996): Memamtinir reduce functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosciences Letters*, 208, pp. 41 – 44.
- Block, F. (1999). Global ischemia and behavioural deficits. *Progress in Neurology*, 58, pp. 279 – 295.
- Bradberry, J. y Phrarm, D. (1993). Stroke. En J. Dipiro, R. Talbert, G. Yee, G. Matzke, B. Wells & M. Posey (Eds.). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach* (pp. 435-458). USA: Appleton & Lance.
- Cabrera, F. (2009). Evaluación de la memoria de trabajo y de referencia en hámsters dorados (*Mesocricetus Auratus*): una tarea de memoria de espacial. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 35, pp. 117-132.
- Cantú-Brito, C., Ruiz-Sandoval, J. L., Murillo-Bonilla, L. M., Chiquete, E., León-Jiménez, C., Arauz, A., Villarreal-Careaga, J., Rangel-Guerra, R., Ramos-Moreno, A., Barinagarrementería, F. y Investigadores del estudio PREMIER (2010). Manejo agudo y pronostico a un año en pacientes mexicanos con un primer infarto cerebral: resultados del estudio multicéntrico PREMIER. *Rev Neurol*, 2010; 51 (11); pp. 641-649.
- Caplan, L. R. y Horn, F. K. S. (2004). Clinical diagnosis of patients with cerebrovascular disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 31, pp. 95 – 109.
- Carrillo-Mora, P., Giordano, M. y Santamaria, A. (2009). Spatial Memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Reseach* (2009) pp. 151 – 164.
- Castillo, J. (2000). Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Revista Neurológica*, 30(5), 459-464.
- Castillo. J., Álvarez-Sabín, Dávalos, A., Díez-Tejedor, E., Lizasoain, I., Martínez-Villa, E., Vivancos, J. y Zarranz, J. (2003). Revisión de consenso. Neuroproteccion farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Neurología*, 18, pp. 398-384.
- Chalela, J., Merino J. y Warach S. (2004). Update on stroke. *Current Opinion in Neurology*, 17, pp. 447 – 451.

- Cheng Y. D., Al-Khoury L. y Zivin J. A. (2004). Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. *The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 1:pp. 36-45.
- Corbett, D y Nurse, S. (1998). The problem of assessing effective degeneration after ischemic: stroke-emerging targets for novel therapeutic strategies. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2, pp. 463 – 469.
- Cramer, S. C. y Nudo R, J. (2010). *Brain Repair After Stroke*. England. Cambridge University Press.
- De Vires, A. C., Nelson, R. J., Traystman, R. J. y Hurn, P. D. (2001). Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 25, pp. 325 – 342.
- Delgado Garcia, M (2009). *Caracterización de las alteraciones motoras de la conducta de nado inducidas por la isquemia cerebral aguda en ratones* (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Dirnagl, U., Ladecola, C. y Moskowitz, A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrative view. *Trends in Neuroscience*, 22, pp. 391 – 397.
- Domjan, M. (2003) *Principios de Aprendizaje y Conducta*. México: International Thompson Editores.
- Doyle, K. P., Simon, R. P. y Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55, pp. 310-318.
- Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the task used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 28, pp. 699 – 318.
- Durukan, A., Strbian, D. y Tatlisumak, T. (2008). Rodents model of ischemic stroke: A useful tool for stroke drug development
- Ennaceur, A. y Delacour, J (2008). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Journal of Behavioral Data. Behavior Brain Research*, 37, pp. 47 – 59.

- Endres, M. y Dirnagl, U. (2002). *Ischemia and stroke. Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 455 – 473.
- Farkas, E y Luiten, P. G. M. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 64, pp. 575 – 611.
- Fisher M. (1999). El objetivo del tratamiento en la enfermedad cerebrovascular aguda y los enfoques terapéuticos neuroprotectores. *Rev Neurol* , 29, pp. 536-544.
- Fisher M. (2004). The ischemic penumbra—identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis*, 17(Suppl 1), pp. 1–6.
- Fuentes-Vargas, M., Santiago-Mejía, J., Pinzón, E y Rodríguez R (2002). Age-Related Susceptibility to Brain Ischemia in Mice. *Drug Development Research*, 57, pp. 161-166.
- Futtrell, N. y Millikan, C. H. (1996). Stroke is an emergency. *Disease-a-Month*, XLII (4), pp. 199-264.
- Gaceta UNAM (2008). Analizan en Iztacala las propiedades antihipertensivas del zapote blanco. México: 4041, 11.
- Garcia J. H. (1984). Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke*, 1, pp. 5-14.
- Gerlai, R. (1996). A new continuous alternation task in T-Maze detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. *Behavioral Brain Research*, 95, pp. 91 – 101.
- Gobbo, O. L. y O'Mara S.M (2004). Impact of enriched environments housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performances after a transient global ischemia. *Behavioural Brain Reseach* 152, pp. 231 – 241.
- Gómez, C., Santiago-Mejía, J. y Rodríguez, R. (2005). 1° Congreso Facultad de Medicina “Dr. Roberto Kretchmen” 2005. Alteraciones motoras inducidas por isquemia cerebral aguda en ratones.
- Gómez, C., Santiago-Mejía, J., Ventura-Martínez, R. y Rodríguez, R. (2006). The sunflower seed test: a simple procedure to evaluate forelimb motor dysfunction after brain ischemia. *Drug Development Research*, 67, pp. 752-756.

- Green, A. R., Odergren, T. y Ashwood, T. (2003). Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (8), pp. 402-408.
- Grubb, N. R., Fox, K. A. Smith, K., Best, J. Blane, A., Ebmeier, K. P. y O'Carroll, R. E. (2000). Memory impairment in out-of-hospital cardiac arrest survivors is associated with global reduction in brain volume, not focal hippocampal injury. *Stroke*, pp. 1509 – 1541.
- Guevara, M. G., Rodríguez, R., Álvarez, A. L., Riaño, A. M. y Rodríguez, P. C. R. (2004). Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Revista Cubana de Medicina*, 43 (4).
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. (2007). Free radicals in biology and medicine (pp. 19 – 32). Oxford: Oxford University Press.
- Hanzell, A. S. (2007). Exotic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochemistry International*, 50 (7-8), pp. 941 – 953.
- Hattori, K., Lee, H., Hurn, P., Crain, B., Traystman, R. y De Vries, C. (2000). Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 31, pp. 1939-1944.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* (2000). 407, pp. 770-776.
- Hossmann, K. A. (2006). Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 26, Nos. 7/8, October/November.
- Hossmann, K. A. (2008). Cerebral Ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*, 26 (7/8), pp. 1057 – 1083.
- Hunter, A. J., Green, A. R. y Cross, A. J. (1995). Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends in Pharmacological Sciences*, 16, pp. 123-128.
- Hunter, A. J., Mackay, K. B. y Rogers, D. C. (1998). To what extent have functional studies of ischaemia in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends in Pharmacological Sciences*, 16, pp. 123 – 128.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI (2010). *Estadísticas a propósito del día internacional de las personas de edad*. México. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2010/edad10.asp?s=inegi&c=2769&ep=43>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI (2009). *Estadísticas a propósito del día internacional del corazón*. México. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/razon09.asp?s=inegi&c=2740&ep=21>

Juurlink, B. H. y Sweeney, M. I. (1997). Mechanism that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 21(2), pp. 121-128.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., y Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science*. New York; McGraw-Hill.

Knieling, M., Metz, G. A., Antonow-Schlorke, I. y Witte, O. W. (2009). Enriched Environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 163, pp. 759 – 769.

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

Klapdor, K., y Van de Staay, J. (1996) The Morris water-escape task in mice: strain differences and effects on intra-maze contrast and brightness. *Physiology & behavior*, 60, pp. 1247 – 1254

Knieling, M., Metz, G. A., Antonow-Schlorke, I., y Witte, O. W. (2009). Enriched Environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 163 (2009), pp. 759 – 769.

Komitova, M., Perfilieva, E., Mattson, B., Ericksson, P. S. y Johansson, B. B. (2006). Enriched Environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive Polydendrocytes in adult rat cortex. *Experimental Neurology* 199, pp. 113 – 121.

Leciñana, M. A. (2006). Capítulo 1: Fisiopatología de la Isquemia Cerebral. *Guía Neurológica 8. Asociación Colombiana de Neurología*, pp. 3 - 17.

- Lee, R. M. (1995). Morphology of cerebral arteries, *Pharmac Ther*, 66, pp. 149 – 173.
- Locchi, F., Dall'Ollio, R., Gandolfi, O. y Rimondini, R. (2007). Water T-Maze, an improved method to assess spatial working memory in rats: Pharmacological validation. *Neuroscience Letters*, 422, pp. 213 – 216.
- Lugo-Sira, D. R. (1996). Patrón de anastomosis del circulo arterioso cerebral en roedores y su relación con las lesiones cerebrales y cambios funcionales inducidos por la restricción controlada del flujo cerebral (Tesis inédita de Maestría en Ciencias Biomédicas) Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Martin, J. H. (1989). *Neuroanatomy. Text and Atlas*. (pp. 81-101). New York, NY: Elsevier.
- Matsumori, Y., Hong, S. M., Fan, Y., Kayama, T., Hsu, Ch. Y., Weinstein, P. R. y Liu, J. (2006). Enriched environment and spatial learning enhance hippocampal neurogenesis and salvages ischemic penumbra after focal cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*, 22, pp. 187 – 198.
- McAuliffe, J., Miles, L. y Vorhee, C (2006). Adult neurological function following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate:water maze performance in dependent on separable cognitive and motor components. *Brain Research*, pp. 1118 – 208 – 221.
- Miranda, Q. J. A. (2004). *Enfermedades cerebrovasculares*. Editorial Oriente. Instituto Cubano del Libro.
- Menzies, S. A., Hoff, J. T. y Bertz, A. L. (1992) Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, 32, 100-6, pp. 106-7.
- Modo, M., Stroemer, R. P., Tnag, E., Veizilc, T., Sowniski, P. y Hodges, H. (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 194, pp. 99-109.
- Morris, R. (1984) Developments of Water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, pp. 47-60.

- Murphy, T. H. y Corbett, D. (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behavior. *Nature Reviews*, 10, pp. 861 – 872.
- Nelson, A., Lebessi, A, Sowinski, P. y Hodges H (1997). Comparison of effects of global cerebral ischemia on spatial learning in standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. *Behavioural Brain Research* 85, pp. 93 – 115.
- Niuro, M., Roger, P.S., Koki, K. y Tetshiko A. (1996). Proximal branching patterns of middle cerebral artery (MCA) in rats and their influence on the size produced by MCA occlusion. *Journal of Neuroscience Methods* 64 (1996), pp. 19 -13.
- Nithianantharajah, J. y Hannan A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7 (September 2006), pp. 697 -709.
- Olton, D. S. y Samuelson, R. J. (1976). Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experiment Psychology (Animal Behaviour)*, 2, pp. 97 – 116.
- Olton, D. S. (1987). The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Pshysiology and Beahavior*, 40, pp. 793 – 797.
- Onténiente, B., Rasika, S., Benchoua, A. y Guéran, C. (2003). Molecular pathways in cerebral ischemia: clues to novel therapeutic strategies. *Molecular Neurobiology*, 27(1), pp. 22-72.
- Ostrosky-Solis, F y Ardila, A (1991). *Diagnóstico del Daño Cerebral. Enfoque Neuropsicológico*. México, Trillas.
- Oyuela, R., Lareo, L., Muñoz, L., Morales, L., Echeverry, S., Uribe, A., Santos, O., & Acuña, A. (2004). Efecto del aprendizaje y la memoria espacial en un péptido sintético en ratas. Estudio preliminar. *Psicología desde el Caribe*, 13, pp. 1- 14.
- Pebet, M. (2002). Epidemiología y factores de riesgo. En F. Micheli, Martin A. Nogués, j. Asconapé, M. Fernández y José Biller. *Tratado de Neurología Clínica* (pp. 390-395). Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Pérez, D. y Biller, J. (2002). Tratamiento de la enfermedad cerebrovascular isquémica. En Micheli, Martin A. Nogués, J. Asconapé, M. Fernández y José Biller. *Tratamiento de*



Neurología Clínica (pp. 445 – 465). Buenos Aires. Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Petito, C. K., Feldmann, E., Pulsinelli, W. A. y Plum, F., (1987). Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37, pp. 1281–1286.

Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Gavi, J., Matias-Guiu, J., Roda J. y Barcia-Albacar J. (2008). Modelos Experimentales de isquemia cerebral. *Revista Neurológica*, 47, pp. 414-426.

Pulsinelli, W. A., Brierly, J. B. y Blum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology*, 11, pp. 491-498.

Reynolds, S., Lane, S. J. y Richards L. (2010). Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention of the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *J Neurodevelopmental Disorder*, 2, pp. 120–132.

Roberts, W. A. (1998). *Principal of animal recognition*. New York, NY: Mc Graw Hill.

Rodríguez, R., Gerson, R y Santiago-Mejía, J (2000). Dexrazoxane-Induced Reduction in Mortality in Mice Subjected to Severe Forebrain Ischemia. *Drug Development Research* 51, pp. 149 – 152.

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

Rodríguez, R., Santiago-Mejía, J., Gómez, C y San-Juan, E. R. (2005). A Simplified Procedure for the Quantitative Measurement of Neurological Deficits After Forebrain Ischemia in Mice. *Journal of Neuroscience Methods* 147, pp. 22 – 28.

Rogers, D. C., Campbell, C. A., Stretton, J. L. & Mackay, K. B. (1997). Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 28, pp. 2060 – 2066.

Rosamond, W. & Flegal, K. (2007). Heart disease and stroke statistics 2007 Update. A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 115, pp. 69-17.

- Sacco, R. (2002). Patogenia, clasificación y epidemiología de las Enfermedades Cerebrovasculares. En L. P. Rowland. *Merrt de Neurologia*. (pp. 227-239). México: Salvat.
- Santiago-Mejía, J., Fuentes-Vargas, M., Ríos, C., Vidrio, H. & Rodríguez, R. (2004). Effect of ascorbic acid, dihydrolopic acid, t-butylhydroquinone, and phenylbutylnitrone on mortality and neurological imparment induced by sequential common carotid artery sectioning in mice. *Drug Development Research*, 63, pp. 212-218.
- Saucier, D, M., Yeger, J. Y., Armstrong E. A., Keller, A., Shultz S. (2007). Enriched environmetand and the effect of age on ischemic brain damage. *Brain Research* (1170) pp. 31-38.
- Scremin, O. U. (2004) Cerebral Vascular System. En G. Paxinos & J.K. Mai (Eds.) The human nervous system (pp. 1325-1348). San Diego, USA: Elsevier.
- Secretaria de Salud SSA (2001). *Programas de acción. Enfermedades cardiovasculares e hipertensión*. México.
- Sharma, S. S. & y Gupta, S. (2007). Neuroprotective effect of MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic in global cerebral ischemia is mediated through reduction of oxidative stress and DNA fragmentation. *European Journal of Pharmacology* 561 (2007) pp. 72–79.
- Shono, Y., Chiaki, Y., Yuji, K., Shinsuke, K., Akina, H., Koichi, K., Hiroyasu, I., Mariko, H., Kenji, H., Hideo, S., Nagara, T., Kazuo, M (2011). Gene expression associated with an enriched environment after transient focal ishemia. *Brain Research* (2011), pp. 60 – 65.
- Sien, Y., Stein, J., Ning, M. y Black-Schaffe, R. M. (2007). Comparison of clinical characteristics and functional outcomes of ischemic stroke in different vascular territories. *Stroke*. 38, pp. 2309 – 2314.
- Sirén, A. L. y Ehrenreich, H. (2001). EPO - a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251, pp. 179–184
- Sosa, T. I., Garcia-Salman, J.D., Rodríguez, Y., Subir's, N., Rodriguez, K y Thomas, A. (2005). Sensibilidad de los modelos de isquemia global y focal en el gerbil de Mongolia. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 36, 2005.

- Tatemehi, T. K., Desmond, D. W., Stern, Y., Paik, M., Sano, M. & Bagiella, E. (1994). Cognitive impairment after stroke: frequency, patterns and relationship to functional abilities. *Journal of Neurology and Neurosurgery Psychiatry*, 57, pp. 202- 207.
- Traystman, R. (2003). Animal models in global cerebral ischemia. *ILAR Journal*, 44, pp. 85-95.
- Vila, C. J. (2009). *Una introducción a la psicofisiología clínica (Segunda edición)*. México: Ediciones Pirámide.
- Wahlgren, N.G., y Ahmnd, N. (2004). Neuroprotection in cerebral ischemia: facts and fancies the need for new approaches. *Cerebrovascular Diseases*, 17(1), pp. 153-168.
- Whishaw. I., Cassel, J. y Jarrard, L. (1995) Rats with fimbria-fornix lesion display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where. *The Journal of Neuroscience* 15, pp. 5779 - 5788
- Winter, B., Bert, B., Fink, H., Drnagl, U. y Endres, M. (2004). Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke*, 35, pp. 191 -195.
- Woo, R. J., Hong, G. K. y Kil, L. K. (2008). Ganglioside GQ1b improves spatial learning and memory of rats as measured by the Y- maze and Morris water maze tests. *Neuroscience Letters* 439, pp. 220 – 225.
- Yuan J. y Yankner B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407, pp. 802-809.
- Zhang, L., Zhang, J., Sun, H., Zhu, H., Lui, H. & Yang, Y. (2013). Enriched Environment elevates corticosteroid receptor levels in hippocampus and restores cognitive function in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 103, pp. 693 – 700.