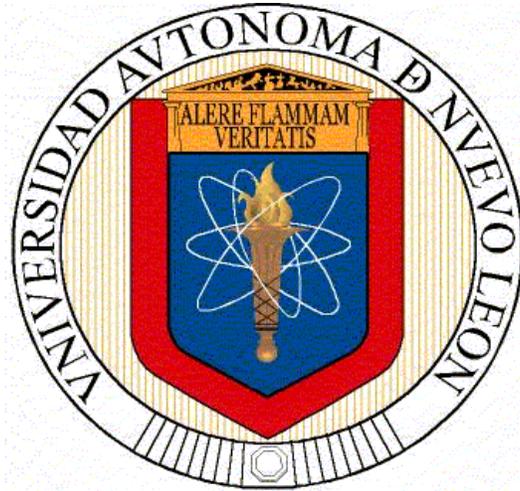


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO EN EL ÁREA
CA1 DEL HIPOCAMPO Y DETERIORO FUNCIONAL SECUNDARIO
A ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN RATAS ENVEJECIDAS**

POR

ELIUD ENRIQUE VILLARREAL SILVA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

DICIEMBRE, 2014

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO EN EL ÁREA CA1
DEL HIPOCAMPO Y DETERIORO FUNCIONAL SECUNDARIO A
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN RATAS ENVEJECIDAS**

Por

ELIUD ENRIQUE VILLARREAL SILVA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

DICIEMBRE, 2014

**“CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO EN EL ÁREA CA1
DEL HIPOCAMPO Y DETERIORO FUNCIONAL SECUNDARIO A
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN RATAS ENVEJECIDAS”**

Aprobación de la tesis:

Dr. med. Santos Guzmán López
Director de la tesis

Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña
Co-Director de tesis

Dr. med. Ángel Raymundo Martínez Ponce de León
Miembro

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Miembro

Zao Cheng Xu M.D. Ph.D
Miembro

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO Y DETERIORO
FUNCIONAL SECUNDARIO A ISQUEMIA CEREBRAL
GLOBAL EN RATAS ENVEJECIDAS”**

Por:

Eliud Enrique Villarreal Silva

Este trabajo se realizó en el Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.), bajo la dirección del Dr. med. Santos Guzmán López y la co-dirección del Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña.

Firmas:

Dr. med. Santos Guzmán López
Director de la tesis

Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña
Co-director de tesis

DEDICATORIA

A Juany, el amor de mi vida.

A mis padres Eliud y Deyanira.

A mi familia de ayer, hoy y mañana.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Santos Guzmán por su incondicional apoyo.

Al Dr. Santos Guzmán, Dr. Rodrigo Elizondo, Dr. Ángel Martínez, Dra. Odila Saucedo y Dr. Zao Xu por sus enseñanzas y colaboración.

A mis estudiantes Rodolfo Salazar, Oscar Quiroga y Miguel Cruz por su constante colaboración para la ejecución de los experimentos de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
Capítulo I	
1. RESÚMEN	2
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	6
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS	33
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	35
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS	37
Capítulo VI	
6. RESULTADOS	66
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN	119
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIÓN	146
Capítulo IX	
9. BIBLIOGRAFÍA	149
Capítulo X	
10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	159

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Envejecimiento en los modelos de IC.	23
2	Somatometría y glucosa sanguínea de las ratas jóvenes y envejecidas utilizadas en el experimento 1.	40
3	Edad y somatometría de las ratas jóvenes y envejecidas utilizadas en el experimento 2.	50
4	Somatometría y glucosa sanguínea de las ratas jóvenes y envejecidas utilizadas en el experimento 3.	60
5	Desenlace posterior a la O4V en el experimento 1.	68
6	Latencias y distancias a la plataforma a los 1, 5 y 10 días del protocolo de aprendizaje en ratas jóvenes y envejecidas.	82
7	Desenlace posterior a la O4V en el experimento 3.	97
8	Comparación de los diferentes estudios que han analizado el efecto del envejecimiento sobre el fenómeno de ICG.	126

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Factores involucrados en la cascada isquémica.	14
2	Modelos de isquemia cerebral.	19
3	Diagrama que muestra la metodología del experimento 1.	43
4	Escala de daño morfológico.	46
5	Escala de patrón morfológico.	47
6	Diagrama representativo de la metodología utilizada en el experimento 2.	53
7	Instrucciones sobre la metodología del Algoritmo para Estrategia de Búsqueda.	57
8	Esquema que muestra la metodología utilizada en el experimento 3.	62
9	Análisis morfológico en base a la escala de daño morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 1.	71
10	Daño morfológico en el área CA1 del hipocampo de ratas jóvenes y envejecidas.	72
11	Análisis morfológico en base al patrón de daño morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 1.	75
12	Patrón morfológico en el área CA1 del hipocampo de ratas jóvenes.	76
13	Patrón morfológico en el área CA1 del hipocampo de ratas envejecidas.	77
14	Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de aprendizaje del experimento 2.	81
15	Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de memoria del experimento 2.	86
16	Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje del experimento 2.	91
17	Análisis de estrategia de búsqueda en los protocolos de memoria del experimento 2.	94
18	Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de aprendizaje del experimento 3.	99
19	Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de memoria del experimento 3.	106
20	Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje del experimento 3 en ratas jóvenes.	110

21	Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje del experimento 3 en ratas envejecidas.	112
22	Análisis de estrategia de búsqueda en los protocolos de memoria del experimento 3.	114
23	Análisis morfológico en base a la escala de daño morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 3.	117
24	Análisis morfológico en base al patrón de patrón morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 1.	118

LISTA DE ABREVIATURAS

IC: Isquemia cerebral

EVC: Evento vascular cerebral

AC: Arresto cardíaco

ICG: Isquemia cerebral global

ICG: Isquemia cerebral global transitoria

ICF: Isquemia cerebral focal

rt-PA: Activador recombinante del plasminógeno tisular

CA1: Cornus Ammonis 1

AEB: Algoritmo para estrategia de búsqueda

**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO EN EL ÁREA
CA1 DEL HIPOCAMPO Y DETERIORO FUNCIONAL
SECUNDARIO A ISQUEMIA CEREBRAL
GLOBAL EN RATAS ENVEJECIDAS**

RESUMEN

Isquemia cerebral y envejecimiento: un ejemplo de la discrepancia clínico-experimental entre la investigación básica y clínica.

La investigación en ciencia básica permite mejorar la traslación de conocimiento hacia la investigación clínica y la práctica médica. Desafortunadamente, la mayoría de los modelos animales que reproducen un cuadro patológico no incluyen importantes variables que permitan extrapolar los resultados obtenidos a la investigación clínica (1). Un ejemplo de esta discrepancia clínico-experimental es la relacionada con la isquemia cerebral y el envejecimiento.

La isquemia cerebral afecta principalmente a los pacientes adultos mayores. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios experimentales en modelos animales no consideran el factor envejecimiento, a pesar de las recomendaciones de los expertos sobre el incluir animales envejecidos en los estudios experimentales (2). De tal modo se identifica una discrepancia clínico-experimental: por un lado la isquemia cerebral que afecta principalmente a paciente mayores de 65 años (3, 4), y por el otro, los estudios experimentales que utilizan ratas entre 3 y 6 meses de edad, lo cual extrapolado a años humanos corresponde a individuos de entre 15 y 18 años de edad (5). Por lo tanto es importante considerar este factor cuando se estudie el fenómeno isquémico en el cerebro y la transferencia de potenciales opciones terapéuticas.

Existe evidencia que soporta que la respuesta a la isquemia cerebral es diferente entre un cerebro joven y uno envejecido (6). Esta diferencia es explicada principalmente por los cambios que ocurren en el cerebro a lo largo de la vida, los cuales modifican el aspecto molecular, celular, tisular y funcional (7). A pesar de lo anterior, el uso de animales envejecidos en los modelos de isquemia cerebral no se ha popularizado completamente. De tal manera que sigue existiendo la necesidad de evaluar a nivel estructural y funcional la respuesta del cerebro envejecido a la isquemia cerebral.

El uso de animales envejecidos en la investigación básica implica los siguientes cuatro inconvenientes: 1) alto costo, 2) alta mortalidad, 3) variabilidad en el daño estructural y el deterioro funcional, y 4) la falta de adaptación de modelos animales y métodos de evaluación para utilizarse en animales envejecidos. Estas condiciones causan una gran dificultad y complejidad en la implementación de los modelos animales, además de dificultar la interpretación de resultados.

Para abordar esta discrepancia clínico-experimental, es necesario incrementar el número de estudios en isquemia cerebral que utilicen animales envejecidos. Para garantizar esto, los estudios necesitan documentar el proceso de envejecimiento, evaluar el efecto de la edad en los modelos animales y crear o adaptar las pruebas funcionales para animales envejecidos. Es imperativo

incluir animales envejecidos en los modelos preclínicos, especialmente en aquellos que estudian enfermedades con una mayor prevalencia en los pacientes adultos mayores, como lo es la isquemia cerebral.

Respondiendo a esta necesidad de contar con mejores modelos animales en el estudio de la isquemia cerebral, adaptamos un modelo de isquemia cerebral y sus métodos de evaluación para su uso en animales envejecidos. De esta manera se establecen las bases para una mejor transferencia de conocimiento (1, 2).

INTRODUCCIÓN

La discrepancia relacionada al envejecimiento en la investigación sobre isquemia cerebral.

En el contexto clínico, la isquemia cerebral (IC) ocurre principalmente en pacientes adultos mayores durante el evento vascular cerebral (EVC) y el arresto cardíaco (AC). En el mundo Occidental, más del 70% de los individuos afectados por EVC y más del 83% afectados por AC tienen más de 65 años de edad (4, 8). Mientras la esperanza de vida continúe creciendo, el número de individuos afectados por IC aumentará en consecuencia. Los estudios experimentales en IC han demostrado la eficacia de una serie de intervenciones terapéuticas, pero la mayoría de ellas ha fallado en demostrar su utilidad en protocolos clínicos. La discrepancia relacionada a la edad es una de las más evidentes y una potencial explicación para estos decepcionantes resultados, ya que estas intervenciones neuroprotectoras se han probado en animales jóvenes a pesar que la IC afecta principalmente a pacientes envejecidos (9-11). Para atender esta discrepancia, es necesario adaptar y utilizar los actuales modelos de isquemia cerebral y sus métodos de evaluación morfológica y funcional para su uso en animales envejecidos con la finalidad de mejorar la transferencia de conocimiento entre la investigación básica y clínica.

La importancia del envejecimiento en la investigación del sistema nervioso central.

En años recientes, el envejecimiento se ha convertido en un tema de interés en la investigación y la salud pública. A medida que la esperanza de vida crece, el número de pacientes adultos mayores con enfermedades asociadas a la edad también aumentará. Entre los problemas de salud más relevantes se encuentran aquellos que producen IC, como el EVC y el arresto cardíaco AC. Hasta el momento existe suficiente evidencia para establecer que el envejecimiento es una variable que debe ser considerada en la investigación sobre IC.

El incremento en las enfermedades relacionadas a la edad causada por el actual incremento de pacientes adultos mayores representa un problema de salud pública. En México, para el año 2050 más del 25 % de la población tendrá más de 60 años de edad (12). Tomando en cuenta que más del 70% de los pacientes afectados por IC tienen más de 60 años (3, 4) es posible identificar un futuro incremento en el número de pacientes afectados por IC con el envejecimiento como una condición presente. De este modo, un adecuado entendimiento de la respuesta del cerebro envejecido a insultos agudos como la isquemia es una prioridad en la investigación en ciencia médica básica.

El envejecimiento como un fenómeno que afecta al Sistema Nervioso Central.

Inicialmente se debe señalar que el envejecimiento es un fenómeno y no una enfermedad. El envejecimiento es definido como un proceso cronológico, complejo y multifactorial que produce cambios anatómicos, fisiológicos, genéticos y moleculares que culminan finalmente con la muerte (13). Está asociado con una alterada respuesta al estrés y una mayor susceptibilidad a las enfermedades como hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades vasculares cerebrales y cardíacas.

El envejecimiento afecta a todos los órganos y sistemas del cuerpo y el sistema nervioso central no es la excepción. El proceso de envejecimiento en el cerebro produce cambios que afectan todas las poblaciones celulares, incluyendo: neuronas, células neurogliales, vasos sanguíneos y la mayoría de los procesos moleculares fisiológicos como: inflamación, estrés oxidativo y neurotransmisión (14). Estos cambios no son homogéneos en todo el cerebro y son el resultado de la interacción entre éste y el medio ambiente (15). Estos cambios justifican el postular una diferente respuesta del cerebro envejecido a la IC.

No se conoce con certeza el momento en el cual inicia el proceso en envejecimiento, sin embargo existen dos principales teorías para explicar el proceso de envejecimiento: envejecimiento programado y envejecimiento por desgaste (16). El envejecimiento programado refiere que el envejecimiento ocurre como resultado de un proceso programado y controlado que produce el deterioro del organismo a medida que pasa el tiempo (17). En contraste, la teoría de desgaste sugiere que el envejecimiento es la suma de insultos ambientales hacia un organismo tales como: toxinas, radicales libres, hidrólisis, glucosilación, uniones cruzadas de puentes disulfuro, radiación, entre otras. (17). Ambas teorías proponen elementos que podrían estar relacionados y explicar entonces el proceso de envejecimiento.

Durante el envejecimiento, el cerebro cambia su anatomía y su función. Algunos de estos cambios son macroscópicos y evidentes aunque otros requieren de una evaluación microscópica, molecular o funcional para ser identificados.

Dentro de los cambios macroscópicos el más evidente es la atrofia cerebral, que se caracteriza por un adelgazamiento de las circunvoluciones y un ensanchamiento de las cisuras corticales, además de producir un aumento en el volumen del sistema ventricular (17). Sobre los cambios microscópicos, durante décadas se había postulado que la muerte de neuronas en la corteza y el hipocampo era una condición que ocurría durante el envejecimiento. Estudios

recientes han identificado que esta pérdida neuronal no ocurre en condiciones normales de envejecimiento y es poco probable que sea la responsable del deterioro cognitivo relacionado a la edad observado en algunos sujetos (18). De acuerdo con lo anterior otros estudios apoyan la existencia de una pérdida de neuronas en corteza e hipocampo, sin embargo esta no es significativa; aunque en otras regiones como el mesencéfalo, procencéfalo basal y algunas áreas de la corteza prefrontal dorsolateral si se presenta una disminución significativa del conteo neuronal (15). Por otra parte la ramificación dendrítica no cambia durante el envejecimiento en el hipocampo y la corteza, pero se ha documentado una disminución de su volumen probablemente debido a una disminución de la densidad sináptica (15). Las células gliales, principalmente astrocitos, muestran una prominente astrogliosis en la sustancia blanca asociada a la edad (17).

El depósito de sustancias en el cerebro es otro fenómeno que caracteriza a los cerebros envejecidos. Entre estas sustancias se encuentran: β -amiloide, marañas neurofibrilares, lipofiscina y cuerpos de poliglucosano (*e.g.* Cuerpos de Lafora y cuerpos amiláceos) (17, 19). Estos cambios han sido observados en el cerebro humano y animal (*e.g.* perro, caballo y simios) (17). Sorprendentemente, a pesar de que los roedores son los mamíferos más utilizados en los estudios de IC, no existen reportes de los cambios degenerativos en estos animales.

En todo el organismo los vasos sanguíneos son afectados por el envejecimiento. En el cerebro estos cambios vasculares son de especial interés debido a su participación en el fenómeno isquémico. Los principales cambios degenerativos son: fibrosis, microhialinosis, mineralización aparición de microhemorragias, amiloidosis y disminución del calibre luminal (17, 19). Además se han reportado cambios en el funcionamiento vascular al identificar que el envejecimiento modifica la regulación de la circulación cerebral durante fenómenos de estrés como la hipotensión (20).

Algunos procesos moleculares como la inflamación, neurotransmisión y estrés oxidativo continúan cambiando durante la vida. Estos cambios contribuyen a propiciar el empeoramiento del daño ocasionado por un EVC, ya que producen un ambiente pro-inflamatorio en el cerebro que promueve la formación temprana de cicatrices. La formación de cicatrices más tempranas se asocia con aumento de fibrosis del tejido y una menor recuperación funcional (14). Por otra parte, las alteraciones en la homeostasis del calcio inducidas por el estrés oxidativo (oxidación de proteínas) producen un cambio en las reservas de calcio intracelular, que se caracteriza por un decremento de la actividad de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y un incremento en la actividad intracelular de las reservas de Ca^{2+} y los canales de calcio dependientes de voltaje (21). La respuesta celular al estrés oxidativo cambia durante la edad

(22). Estos procesos celulares son importantes en la cascada isquémica y determinantes claves para entender las diferentes respuestas del cerebro envejecido a la IC.

Funcionalmente, el proceso de envejecimiento en el cerebro se observa a través de un deterioro gradual de las funciones físicas y cognitivas que avanzan a medida que también avanzan los cambios morfológicos macroscópicos y microscópicos.

Tomando en cuenta estos cambios estructurales y funcionales debemos identificar que muchos de ellos toman un papel importante en la cascada isquémica y explican la diferente respuesta de un cerebro envejecido a la isquemia cerebral (Figura 1).

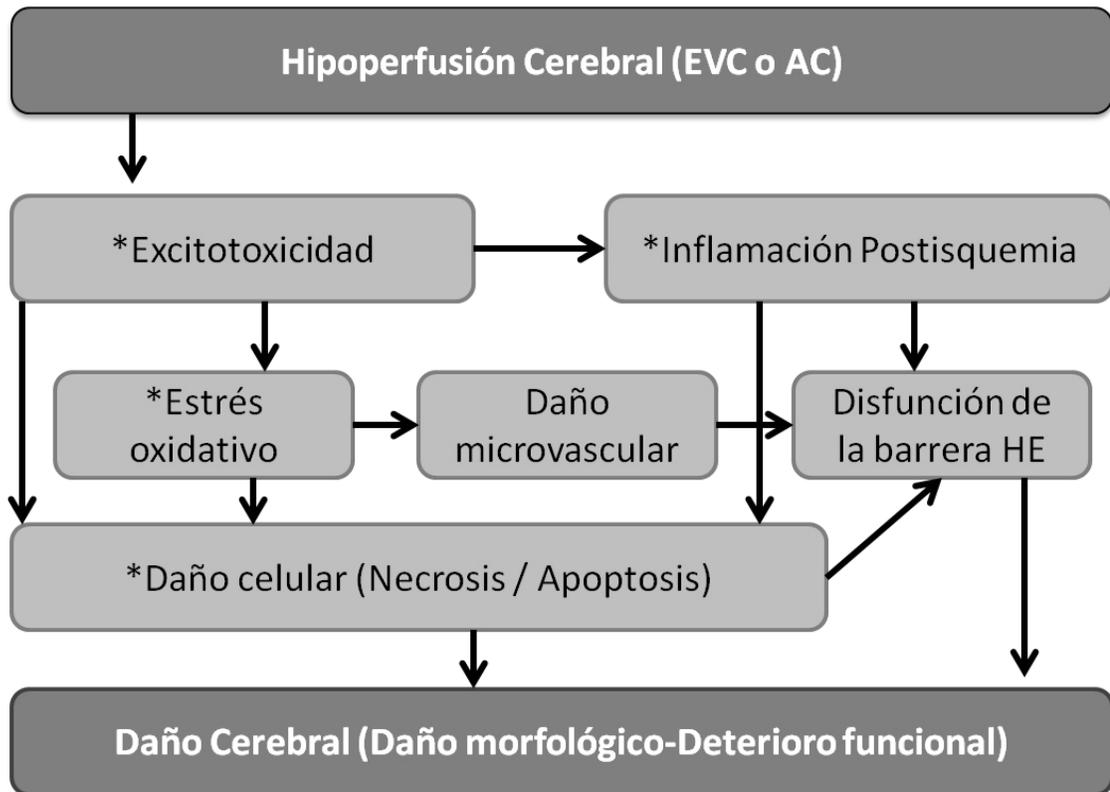


Figura 1. Factores involucrados en la cascada isquémica. Se identifican con (*) los factores en los que se ha documentado que el envejecimiento modifica dicho factor.

Efecto del envejecimiento sobre la evolución clínica de los pacientes afectados por IC.

El envejecimiento es el principal factor de riesgo no modificable para sufrir un EVC (23). La incidencia el EVC se duplica por cada década sucesiva a los 55 años (23). Adicionalmente, el envejecimiento es el factor de riesgo líder y el principal factor predictor del desenlace clínico posterior a un EVC (24). De tal modo, la edad es un importante factor a considerar durante el tratamiento y evolución de estos pacientes.

Independientemente del tipo de EVC que afecte a un paciente, el envejecimiento parece estar asociado con un mal pronóstico (23). El envejecimiento incrementa la mortalidad y letalidad en pacientes adultos mayores (25). Los pacientes adultos mayores son más susceptibles a ser egresados a instituciones de cuidado de salud, debido a una severa discapacidad en los siguientes 3 meses posteriores al evento (26). A pesar de lo anterior el envejecimiento no ha mostrado tener un efecto directo sobre la recuperación funcional neurológica de los pacientes (23).

La edad es un marcador biológico del desenlace del tejido cerebral en la IC. Lo anterior se ha comprobado al identificar que existe una dependencia en la conversión del tejido isquémico a infarto relacionada a la edad (24). Los

mecanismos moleculares o celulares responsables de esta dependencia se desconocen con claridad, pero se postula que podrían ser explicados por los cambios que ocurren en la macro y micro circulación del cerebro envejecido (24). Otros factores que podrían estar causando esta dependencia son los cambios en el metabolismo energético, transmisión sináptica y susceptibilidad al estrés oxidativo, aunque la mayoría de estos cambios se han identificado en modelos animales y no en humanos.

Las opciones de tratamiento específico disponibles en la actualidad para los pacientes afectados por IC a causa de un EVC isquémico se limitan al factor activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA). Debido a que los pacientes mayores de 80 años son excluidos de los estudios clínicos, existe poca evidencia respecto al uso de rt-PA en esta población. Hasta la fecha, los escasos estudios que han evaluado el efecto del rt-PA en pacientes mayores de 80 años indican que en comparación con pacientes jóvenes, la reperfusión y la incidencia de hemorragia intracerebral como complicación del tratamiento no se modifican significativamente (27, 28). Debido a lo anterior se demostró que la eficacia y seguridad del rt-PA en pacientes envejecidos con EVC isquémico no depende de la edad del paciente (28) y se recomienda su uso al demostrarse un mayor beneficio en comparación con el riesgo.

En los países en vías de desarrollo, como lo es México, el número de pacientes con EVC isquémico que reciben terapia con rt-PA es bajo. Los principales factores que contribuyen a este hecho son el retraso prehospitalario y la carencia de personal e infraestructura adecuada para la aplicación de este medicamento (28). La población no tratada representa un importante grupo a considerar para la administración de nuevos tratamientos cuyo objetivo sería la limitación del daño y recuperación del deterioro funcional.

De esta manera deben realizarse más estudios que evalúen el comportamiento del envejecimiento en conjunto con otras variables como comorbilidades y exposiciones ambientales para entender mejor su interacción durante el fenómeno isquémico del cerebro.

Modelos animales de IC y el efecto del envejecimiento sobre ellos.

Desde la década de 1960, la relación entre el envejecimiento y la IC ha sido estudiada en modelos animales. Sin embargo, la gran mayoría de las intervenciones terapéuticas y diagnósticas se siguen probando en animales jóvenes. Las probables causas de esta discrepancia están relacionadas con el alto costo de los animales envejecidos y la falta de adaptación de más modelos experimentales de IC y sus métodos de evaluación. Los animales más

frecuentemente utilizados en estos modelos son los roedores pequeños como ratones y ratas, siendo estas últimas utilizadas aún más frecuentemente.

Los modelos experimentales de IC se clasifican en modelos de isquemia cerebral focal (ICF) y global (ICG) (29) (Figura 2). Los modelos de ICF se subclasifican en aquellos que producen una alteración de un territorio vascular (focal propiamente dicha) y aquellos que afectan de forma multifocal varios territorios arteriales. Estos modelos reproducen el fenómeno observado durante un EVC isquémico de un territorio vascular determinado, teniendo una morfología de daño donde se identifica una zona central y una zona de penumbra. Los modelos de ICG se subclasifican en aquellos que producen una hipoperfusión total del encéfalo (ICG completa) y aquellos que producen una hipoperfusión casi total (ICG incompleta). Los modelos de ICG completa replican la hipoperfusión ocurrida durante un AC, mientras los de ICG incompleta reproducen un EVC maligno.

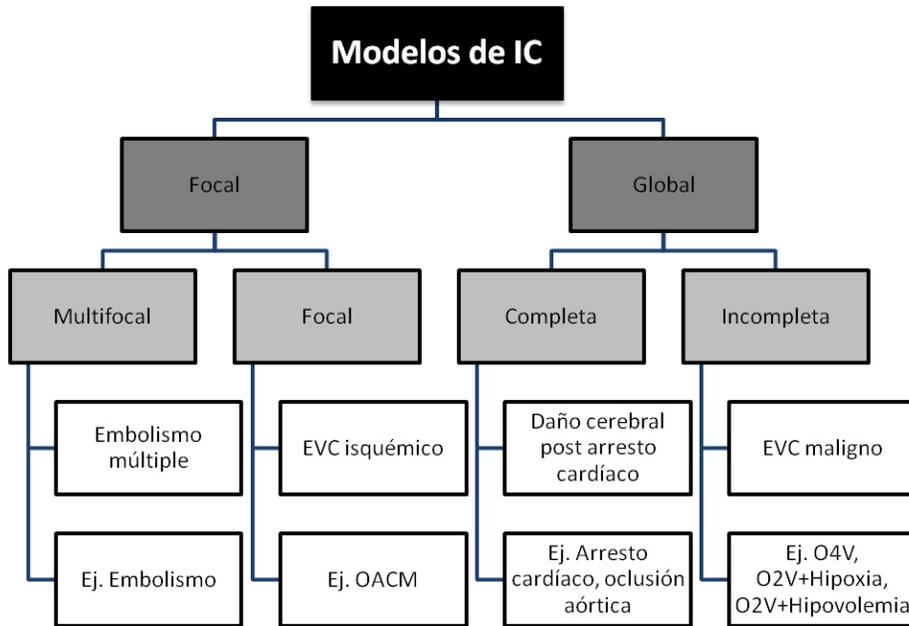


Figura 2. Modelos de isquemia cerebral. Esquema que muestra los principales modelos de IC actualmente utilizados. Se identifican principalmente dos tipos de modelos: IC Focal e IC Global. El modelo utilizado en el presente proyecto es el modelo de oclusión de cuatro vasos (O4V), el cual representa un modelo de IC Global incompleta.

El efecto del envejecimiento sobre los modelos de IC ha sido evaluado en ambos tipos de modelos de IC, aunque la evidencia más abundante se refiere a los modelos de ICF. Las conclusiones sobre el análisis de información referente a estos modelos y el envejecimiento se exponen a continuación (Tabla 1).

En los modelos de ICF se ha reportado una mayor tasa de mortalidad durante o después de la inducción de isquemia (6). El daño morfológico evaluado a través del volumen de infarto mostró resultados contradictorios, habiendo estudios que establecen mayor volumen de infarto en roedores viejos (30-32), mientras que otros refieren no encontrar diferencias significativas en el volumen de infarto de roedores jóvenes contra envejecidos (33-37). Funcionalmente se conoce que los roedores envejecidos tienen la capacidad de recuperarse posteriormente a un infarto cortical focal, pero en un menor grado que los jóvenes (32, 34, 37-39). A la fecha se desconocen con certeza los mecanismos moleculares y tisulares responsables de estos diferentes efectos morfológicos y funcionales en los modelos de ICF (9).

Funcionalmente la recuperación es más limitada en animales envejecidos tras el uso de modelos de ICF (9). De este modo, los estudios que han analizado el envejecimiento en ratas de 24 meses han mostrado un daño más severo y una recuperación menor (30, 34, 35, 40-42) Debe mencionarse que los animales envejecidos por lo regular tienen un desempeño funcional menor al de los

animales jóvenes antes de la IC (35, 43), lo cual explica parcialmente la menor recuperación funcional observada en estos reportes.

La escasa evidencia disponible referente al efecto del envejecimiento sobre los modelos de ICG indica que en las ratas envejecidas existe una mayor mortalidad (44), mayor daño morfológico y mayor deterioro funcional (45). Debe señalarse que existen reportes que establecen un aparente efecto neuroprotector del envejecimiento sobre las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo (30, 46). Destaca también la ausencia de información relacionada a pruebas funcionales específicas para daño en el hipocampo.

De este modo surgen tres principales áreas de oportunidad relacionadas al efecto del envejecimiento sobre el área CA1 del hipocampo y el deterioro funcional que este produce: 1) Actualmente no se ha identificado con certeza el efecto del envejecimiento sobre la respuesta de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. 2) Existe necesidad de adaptar los modelos animales de IC así como los métodos de evaluación ya que estos fueron diseñados para ser utilizados en animales jóvenes. 3) Se desconoce el efecto que tiene la lesión de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo sobre el desempeño funcional en pruebas específicas para esta región.

Las anteriores áreas de oportunidad deben atenderse, antes de considerar evaluar intervenciones terapéuticas en un modelo de ICG en animales envejecidos. Para ello es necesario caracterizar el efecto de la ICG en animales envejecidos realizando evaluaciones a corto y largo plazo desde una perspectiva morfológica y funcional, con la finalidad de resolver la discrepancia clínico-experimental relacionada con el envejecimiento en los modelos de IC. De esta manera es evidente la discrepancia observada en el efecto sobre las neuronas piramidales del hipocampo y el deterioro funcional relacionado a este mismo. Por lo tanto el presente proyecto de tesis utilizó un modelo de ICGT en ratas envejecidas para realizar un análisis morfológico sobre las neuronas piramidales del hipocampo y el consecuente deterioro funcional.

Variable	ICF	ICG
Mortalidad	Mayor en ratas envejecidas	Mayor en ratas envejecidas
Daño morfológico	Mayor volumen de infarto en ratas envejecidas	Mayor daño en corteza y estriado. Discrepancia respecto al daño en el hipocampo CA1
Deterioro funcional	Recuperación funcional más lenta y en menor grado	Recuperación menor y en un menor grado No evaluaron la función del hipocampo

Tabla 1. Envejecimiento en los modelos de IC. Se organizan los hallazgos de la búsqueda bibliográfica realizada para identificar el efecto del envejecimiento sobre los modelos de IC. Los datos obtenidos fueron sintetizados en: mortalidad, daño morfológico y deterioro funcional. Se muestra la discrepancia observada en el daño sobre el área CA1 del hipocampo y la falta de estudios funcionales que evalúen la función del hipocampo envejecido dañado.

Hipocampo morfología y función.

El hipocampo es un componente de la formación del hipocampo y forma parte del sistema límbico. Está localizado en la profundidad del encéfalo y se le atribuye el proceso cognitivo de la memoria.

Estructuralmente, está formado por neuronas organizadas en regiones designadas como cornus Ammonis (CA): CA1, CA2, CA3, CA4. De estas regiones CA1 y CA2 presentan una mayor susceptibilidad a la isquemia (CA1 y CA2 = H1 o sector de Sommer). La organización tisular del hipocampo tiene tres capas de corteza (arquicorteza). Una de estas capas contiene a los cuerpos de neuronas piramidales, las cuales se organizan en 2 a 3 o tres capas. Las neuronas piramidales se caracterizan por presentar un cuerpo redondo y nucléolo central. Los axones de las neuronas piramidales de CA1, CA2 y CA3 se dirigen eferentemente a través del fórnix hacia el cuerpo mamilar. Las aferencias de las neuronas piramidales de CA3 provienen principalmente del giro dentado GD, el cual a su vez recibe aferencias de la neocorteza. Las aferencias de CA1 provienen de fibras colaterales desde CA3 (fibras colaterales de Schaffer).

La función del hipocampo está asociada con los procesos espaciales y la memoria. La memoria puede ser clasificada en memoria a corto plazo (60 minutos) y largo plazo (varios días o más). El hipocampo participa en la conversión de la memoria de corto a largo plazo. Además al hipocampo se le

han asociado también la función del comportamiento espacial, el cual al integrarse con la función de memoria forma la memoria espacial. La memoria espacial forma parte de la memoria declarativa sobre hechos y lugares.

La exploración de la memoria espacial es el método más ampliamente aceptado para explorar la función del hipocampo en los animales de experimentación y en humanos. El método más ampliamente aceptado para evaluar la memoria espacial en roedores es el laberinto de agua de Morris.

Debido a que los modelos de ICG afectan principalmente a las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, se identifica que la exploración funcional de la memoria espacial resulta el método más adecuado para evaluar el deterioro funcional producido por estos modelos.

Caracterización del efecto del envejecimiento sobre el daño producido por ICG en las neuronas piramidales de CA1.

Los modelos de ICG inducen una hipoperfusión generalizada del cerebro por un periodo determinado de tiempo, afectando áreas vulnerables del encéfalo como las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Respecto a los estudios que utilizan modelos de ICG en animales envejecidos, la limitada evidencia disponible sugiere que el envejecimiento resulta un factor deletéreo que incrementa la mortalidad (44, 45), acelera el inicio y la exacerbación de

lesiones isquémicas (47), e induce un incremento en la sensibilidad y vulnerabilidad del insulto isquémico (45). Referente a al daño en el hipocampo, se han encontrado reportes contradictorios sobre la respuesta del área CA1 a la ICG entre ratas envejecidas y jóvenes. Algunos estudios han establecido un daño más severo en las ratas envejecidas (48, 49), mientras que otros han observado mayor daño y progresión más rápida del mismo en ratas jóvenes (30, 46), sugiriendo incluso un posible efecto neuroprotector del envejecimiento sobre las neuronas piramidales de CA1. De esta manera, el efecto del envejecimiento sobre el hipocampo CA1 sigue sin determinarse claramente.

La anterior contradicción representa un reto metodológico para resolver la discrepancia relacionada a la edad en los estudios de IC e incrementar el uso de ratas envejecidas en los modelos de ICG. De esta manera, se identifica la primera área de oportunidad; la cual involucraría evaluar comparativamente entre ratas jóvenes y envejecidas la mortalidad y el daño morfológico de las neuronas piramidales de CA1 posterior a un modelo de ICG utilizando evaluaciones seriadas en diferentes días posteriores a la reperusión.

Adaptación de las evaluaciones funcionales de aprendizaje y memoria espacial en ratas envejecidas.

En el proceso de mejora continua de la investigación básica sobre isquemia cerebral, además de la adaptación de importantes variables como lo es el envejecimiento, también se recomienda realizar evaluaciones funcionales (2). Los modelos de ICG producen daño en neuronas del hipocampo el cual se tiene participación en los procesos de aprendizaje y memoria espacial. El laberinto de agua de Morris (LAM) es el método más aceptado para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en roedores pequeños. Desde las primeras descripciones realizadas por Morris *et al.* en 1984 (50), muchos protocolos y opciones de medición han sido descritas para evaluar las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial. Sin embargo estos protocolos y mediciones fueron diseñados para utilizarse en animales jóvenes. Por lo tanto su uso en animales envejecidos demanda algunas consideraciones y adaptaciones son necesarias para explorar mejor el desempeño funcional.

El LAM usualmente consiste en protocolos de aprendizaje y memoria (51). En el protocolo de aprendizaje, la latencia a plataforma (i.e. tiempo que tarda la rata en llegar a la plataforma desde un punto de salida previamente determinado) y distancia a plataforma (i.e. distancia total recorrida hasta llegar a la plataforma desde un punto de salida previamente determinado) son las más utilizadas

para evidenciar aprendizaje espacial (51). En los protocolos de memoria, el porcentaje de tiempo en el cuadrante correcto (i.e. porcentaje de tiempo invertido en el cuadrante donde estaba la plataforma) y el número de cruzamientos a la zona donde estaba la plataforma (i.e. número de veces que la rata cruza por la zona donde estaba la plataforma), son las mediciones más utilizadas para evidenciar la adquisición de memoria durante las pruebas de memoria (51).

El desempeño funcional en LAM declina a medida que avanza la vida de un animal (52, 53). Aunque el deterioro funcional es evidente en la mayoría de los animales, este no afecta homogéneamente a todos los animales por igual, resultando que algunos animales envejecidos tienen un desempeño similar al encontrado en los animales jóvenes mientras que otros sí sufren alteraciones evidentes (53). Esta situación produce una alta variabilidad en los resultados de los protocolos de aprendizaje y memoria, lo cual dificulta la determinación de un parámetro de normalidad y por lo tanto una adecuada comparación entre grupos control y experimental.

Las explicaciones más aceptadas para este deterioro funcional relacionado a la edad son los cambios que ocurren en las habilidades de nado, locomoción y estrategias de búsqueda (54, 55). Otros estudios, han sugerido que el deterioro funcional relacionado a la edad en las habilidades de aprendizaje y memoria

espacial es debido a cambios en la función y morfología del hipocampo. Sin embargo ha sido difícil encontrar marcadores tisulares consistentes sobre este deterioro cognitivo y se han encontrado observaciones discrepantes a este respecto (54, 56). Esta situación hace evidente la necesidad de nuevas opciones de medición que exploren más eficientemente el desempeño funcional en aprendizaje y memoria espacial durante las pruebas del LAM.

Para resolver este problema metodológico, el análisis de la estrategia de búsqueda es una opción razonable. La estrategia de búsqueda se refiere a la secuencia de movimientos y cambios en la trayectoria que la rata realiza hasta encontrar la plataforma (en el protocolo de aprendizaje) o cruzar la zona donde estaba la plataforma (en el protocolo de memoria). Estudios recientes sobre la estrategia de búsqueda han encontrado modificaciones en la estrategia de búsqueda relacionadas a la edad de los animales (55).

Estos estudios utilizaron métodos distintos para evaluar la estrategia de búsqueda. Estos métodos utilizan sistemas de cómputo o métodos puramente apreciativos; y su complejidad, reproducibilidad y alta cantidad de estrategias sin clasificar hacen difícil su aceptación general (55, 57, 58). Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un método válido, reproducible y fácil de utilizar para evaluar este componente de las pruebas de aprendizaje y memoria.

De este modo se asume que la estrategia de búsqueda es un componente principal en las pruebas funcionales y debido a la variabilidad que se observa en las mediciones tradicionales de animales envejecidos su uso en este grupo de edad es aún más relevante. Por lo anterior, la segunda área de oportunidad identificada fue caracterizar el desempeño funcional de las ratas Wistar macho envejecidas en los protocolos del LAM analizando las variables tradicionales y la estrategia de búsqueda.

Caracterización del efecto del envejecimiento sobre el deterioro funcional por daño en el área CA1 del hipocampo en pruebas de aprendizaje y memoria espacial utilizando mediciones tradicionales y análisis de estrategia de búsqueda en el LAM.

La función del hipocampo está relacionada con el aprendizaje y la memoria espacial (51); y esta función cognitiva es explorada por medio de los protocolos del LAM. Hasta ahora, diferentes protocolos del LAM se han descrito para evaluar el aprendizaje espacial en animales envejecidos, pero no existe un consenso sobre qué protocolo es el mejor, aunque se identifican algunas recomendaciones generales como: periodos más largos de evaluación, tiempo más prolongado en cada prueba y precaución en el análisis de datos debido a una alta variabilidad en los resultados.

El deterioro funcional que producen los modelos de ICG por daño en el hipocampo CA1 de ratas envejecidas aún no ha sido evaluado con pruebas específicas para valorar la función del hipocampo en el aprendizaje y la memoria espacial. Algunos reportes que han utilizado evaluaciones funcionales no relacionadas a la memoria espacial indican que los animales envejecidos presentan una recuperación más lenta y en menor medida en comparación con la recuperación de animales jóvenes, aunque estos estudios han utilizado pruebas que no evalúan la función del hipocampo (45). En roedores jóvenes se ha evidenciado que el daño en las neuronas piramidales del área CA1 produce una alteración en el aprendizaje y memoria espacial durante protocolos del LAM (59).

De este modo, al ser el aprendizaje y memoria espacial una de las principales funciones del hipocampo es entendible realizar el análisis funcional de los modelos de ICG utilizando los protocolos del LAM con mediciones tradicionales y el análisis de la estrategia de búsqueda. De esta manera se identifica la tercera área de oportunidad atendida durante la ejecución de este proyecto.

Necesidad de caracterizar el daño morfológico y el deterioro funcional secundario a ICG en ratas envejecidas.

Con la anterior introducción se identificaron las tres principales áreas de oportunidad que se atendieron en la ejecución de este proyecto. 1) La falta de caracterización del daño morfológico en el área CA1 del hipocampo tras la inducción de ICGT en ratas envejecidas de una cepa común entre los laboratorios de ciencia básica. 2) La experiencia actual sobre el desempeño funcional de animales envejecidos a en las pruebas funcionales del LAM ha establecido algunas diferencias que deben ser caracterizadas mediante el uso de mediciones tradicionales y el análisis de la estrategia de búsqueda. 3) La identificación del deterioro funcional producido por ICGT en ratas envejecidas aún no se ha evaluado con pruebas específicas para daño en el hipocampo. Estos tres aspectos fueron abordados utilizando tres experimentos consecutivos e independientes, cada uno con contribuciones originales.

HIPOTESIS

Hipótesis.

Hipótesis de trabajo:

Existe daño morfológico en el área CA1 del hipocampo y deterioro funcional en el aprendizaje y memoria espacial secundario a isquemia cerebral global transitoria en ratas envejecidas.

Hipótesis nula:

No existe daño morfológico en el área CA1 del hipocampo y deterioro funcional en el aprendizaje y memoria espacial secundario a isquemia cerebral global transitoria en ratas envejecidas.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Caracterizar el daño morfológico del área CA1 del hipocampo y el deterioro funcional en el aprendizaje y memoria espacial secundario a isquemia cerebral global en ratas envejecidas.

Objetivos particulares.

- Evaluar el daño morfológico a nivel del área CA1 del hipocampo en ratas envejecidas (18-21 meses de edad) a los 4, 7 y 14 días posterior a reperfusión (DPR).
- Evaluar el desempeño funcional de ratas envejecidas en pruebas de aprendizaje y memoria espacial utilizando mediciones tradicionales y análisis de estrategia de búsqueda.
- Evaluar el deterioro funcional en el aprendizaje y memoria espacial en ratas envejecidas desde los 7 hasta los 21 DPR.

MATERIAL Y METODOS

Metodología general.

La metodología general de este proyecto se realizó por medio de tres experimentos independientes en los cuales se abordó cada uno de los objetivos particulares.

- Experimento 1. Análisis del daño morfológico en las neuronas piramidales del área CA1 secundario a 15 minutos de ICG por O4V en ratas envejecidas.
- Experimento 2. Caracterización del desempeño funcional de ratas envejecidas en los protocolos de aprendizaje y memoria del LAM.
- Experimento 3. Análisis del deterioro funcional en el LAM secundario a daño morfológico en las neuronas piramidales del área CA1 en ratas envejecidas.

Todos los procedimientos realizados en animales durante los tres experimentos fueron conducidos bajo la autorización del comité de ética institucional (Clave de aprobación por comité de ética: AH13-004) y la regulación nacional para el cuidado y uso de animales (NOM-062-ZOO-1999).

Experimento 1. Análisis del daño morfológico en las neuronas piramidales del área CA1 secundario a 15 minutos de ICG por O4V en ratas envejecidas.

Animales de experimentación.

Cuarenta y ocho ratas Wistar macho fueron utilizadas en el experimento 1, incluyendo 22 jóvenes (3-6 meses) y 26 envejecidas (18-21 meses). Todas las ratas fueron mantenidas en cajas plásticas bajo ciclos constantes de luz-obscuridad de 12 horas y con alimento y agua *ad libitum*. Se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura (22 ° C) y humedad (60%). Los animales que mostraron un mal estado general de salud fueron excluidos de los experimentos. La edad, peso, longitud y glucosa sanguínea fueron medidas antes y después de la inducción de ICG (Tabla 2).

Grupo	Edad (meses)	Peso (g)	Longitud (cm)	Glucosa sanguínea antes de la oclusión (mg/dl)	Glucosa sanguínea después de reperfusión (mg/dl)
Joven	5 ± 1	408 ± 110	40.67 ± 2.5	86.67±14.9	129.46±39.64
Envejecido	19 ± 1	671 ± 167	44.5 ± 1.1	93.60±15.67	124.94±36.91

Tabla 2. Somatometría y glucosa sanguínea de las ratas jóvenes y envejecidas utilizadas en el experimento 1. Se muestra la edad, peso y talla de las ratas utilizadas en el experimento 1. Se muestra además la glucosa sanguínea pre y post reperfusión de las ratas jóvenes y envejecidas con isquemia completa. Los valores representan media ± desviación estándar.

Inducción de ICG.

Se indujo ICG durante 15 minutos en ratas jóvenes y envejecidas usando el modelo de oclusión de 4 vasos (O4V) con modificaciones (60). El modelo de O4V se realizó en dos días. En el primer día, las ratas fueron anestesiadas usando isofluorano al 1-2% mezclado con oxígeno al 33%. Un dispositivo de oclusión (tubo de silicón) fue colocado libremente alrededor de la arteria carótida común para permitir la posterior oclusión de los vasos. Posteriormente, los animales fueron colocados en un marco estereotáxico y las arterias vertebrales fueron electrocauterizadas por medio de una incisión en la región nual. En un segundo día, ambas arterias carótidas comunes fueron ocluidas utilizando los dispositivos colocados en el primer día.

Posterior a la oclusión de las arterias carótidas comunes las ratas envejecidas y jóvenes fueron asignadas a tres subgrupos dependiendo de la presencia, pérdida parcial o completa del reflejo postural posteriormente a la oclusión de ambas arterias carótidas comunes: *isquemia-completa*, *isquemia-incompleta* y *no-isquemia*. Las ratas asignadas al subgrupo de *isquemia-completa* fueron aquellas que perdieron el reflejo postural dentro de los primeros 60 segundos (sin recuperación del mismo parcial o total durante el tiempo de isquemia). Los animales que no cumplieron los criterios de *isquemia-completa* fueron reasignados al subgrupo de *isquemia-incompleta* si perdieron el reflejo postural

pero lo recuperaron parcial o completamente durante el tiempo de isquemia o al subgrupo *no-isquemia* si nunca perdieron el reflejo postural. En las ratas clasificadas como isquemia completa o incompleta, los dispositivos de oclusión fueron dejados en su posición por 15 minutos, seguidos de su retiro para permitir la reperfusión. Para las ratas del subgrupo no isquemia, los dispositivos de oclusión fueron inmediatamente retirados dentro de los primeros 90 segundos posteriores a su colocación. Las ratas envejecidas y jóvenes con isquemia completa, incompleta o no isquemia fueron reasignadas para su evaluación a los días 4, 7 y 14 PAR. Las ratas que murieron durante la isquemia o posterior a la reperfusión fueron incluidas para el análisis del desenlace pero excluidas del análisis morfológico.

El nivel de glucosa sanguínea fue evaluado 5 minutos antes de la oclusión y 5 minutos después de la reperfusión vía glucometría capilar tomando una muestra de la porción distal de la cola. Durante la ICG, los animales fueron mantenidos a 37 ± 1 ° C; la temperatura corporal fue medida y controlada por medio de una sonda rectal asociada a un termorregulador. Posterior a la O4V, las ratas fueron mantenidas en sus respectivas cajas y se les permitió acceso libre a agua y alimento hasta el día de evaluación morfológica. La evaluación morfológica fue realizada a los 4, 7 y 14 DPR.

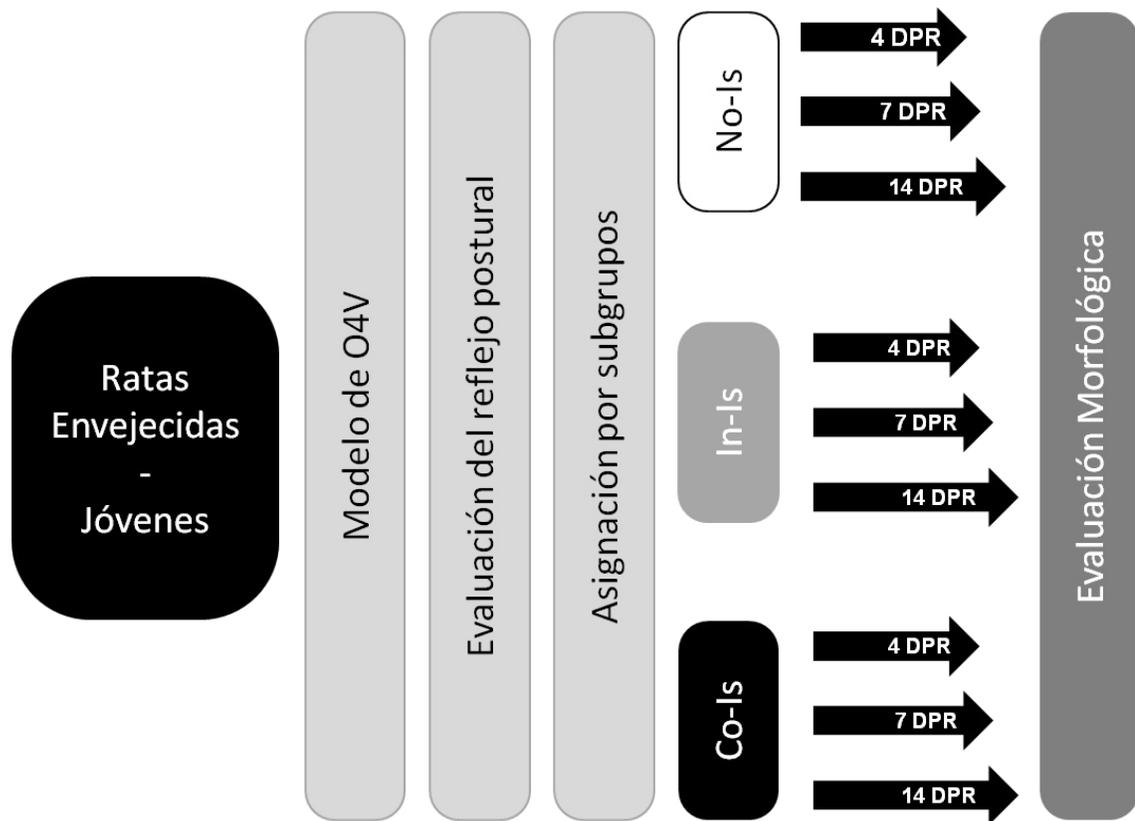


Figura 3. Diagrama que muestra la metodología del experimento 1. En las ratas jóvenes y envejecidas se llevó a cabo la misma metodología durante el experimento 1. Posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes en el segundo día del modelo de O4V se realizó la asignación por subgrupos dependiendo de la presencia, ausencia parcial o completa del reflejo postural. Posteriormente las ratas de cada subgrupo fueron reasignadas a un día de evaluación morfológica a los 4, 7 o 14 días posterior a reperusión (DPR).

Evaluación morfológica.

La evaluación morfológica se llevó a cabo en los días 4, 7 o 14 posterior a la reperusión. Las ratas fueron perfundidas utilizando una técnica transcardiaca con buffer salino de fosfatos (PBS), seguido de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros fueron cortados en bloques de 2 mm de grosor y embebidos en parafina para posteriormente realizar microsecciones de 5 μm . Tres microsecciones del hipocampo dorsal fueron recolectados cada 25 μm y teñidas con hematoxilina y eosina para su posterior evaluación.

Utilizando un microscopio de luz, tres microsecciones del hipocampo dorsal (de -3.3 a -4.3 mm relativo al bregma) fueron bilateralmente analizadas respecto al *daño morfológico* y el *patrón morfológico*. El daño morfológico fue evaluado utilizando un aumento de 4x y 10x de acuerdo a la siguiente escala: 0, sin daño; 1, daño neuronal limitado a la porción medial de CA1; 2, daño neuronal alcanzando la porción intermedia de CA1; 3, daño neuronal alcanzando la porción CA3 (Figura 4) (60). El patrón de daño fue evaluado utilizando un aumento de 10x y 40x de acuerdo a la siguiente escala: 0, normal, *i.e.*, sin neuronas dañadas; 1, algunas neuronas dañadas; 2, muchas neuronas dañadas; 3, la mayoría de las neuronas dañadas (Figura 5) (48). Ambas escalas fueron reportadas como el promedio entre ambos hemisferios. Todas

las evaluaciones fueron realizadas por un investigador quien se mantuvo cegado a la distribución de grupos y subgrupos.

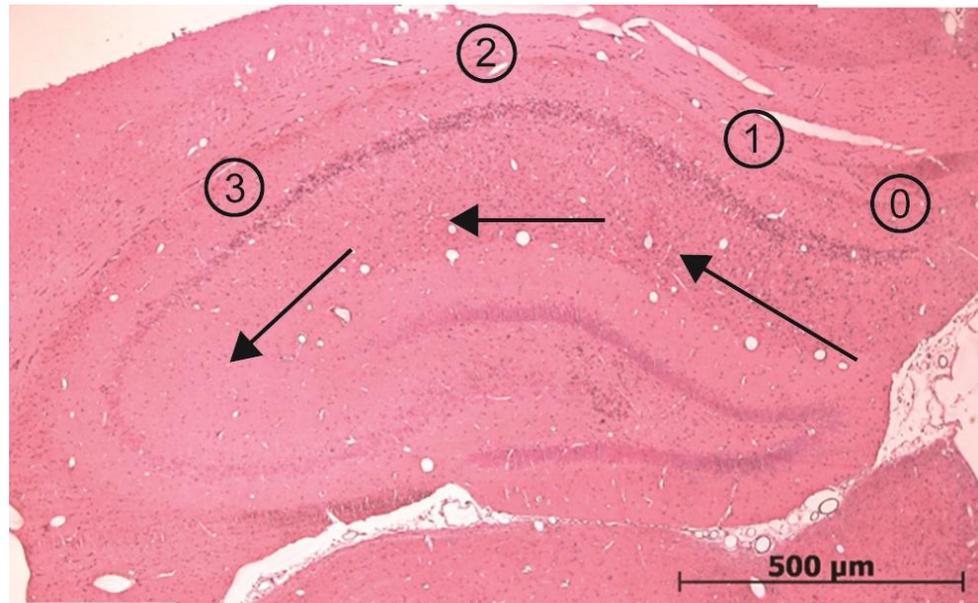


Figura 4. Escala de daño morfológico. Se observa una imagen representativa del área CA1 del hipocampo a un aumento de 10x para evidenciar la progresión del daño de medial a lateral que justifica el uso de la escala de daño morfológico. 0, sin daño neuronal; 1, daño limitado a la región medial de CA1; 2, daño limitado a la porción intermedia de CA1; 3, daño neuronal extendido hasta la porción lateral de CA1 limitado hasta la zona CA3. El daño está designado por la porción más lateral donde se identifica reducción del tamaño neuronal (picnosis) y fragmentación del núcleo (cariorexis).

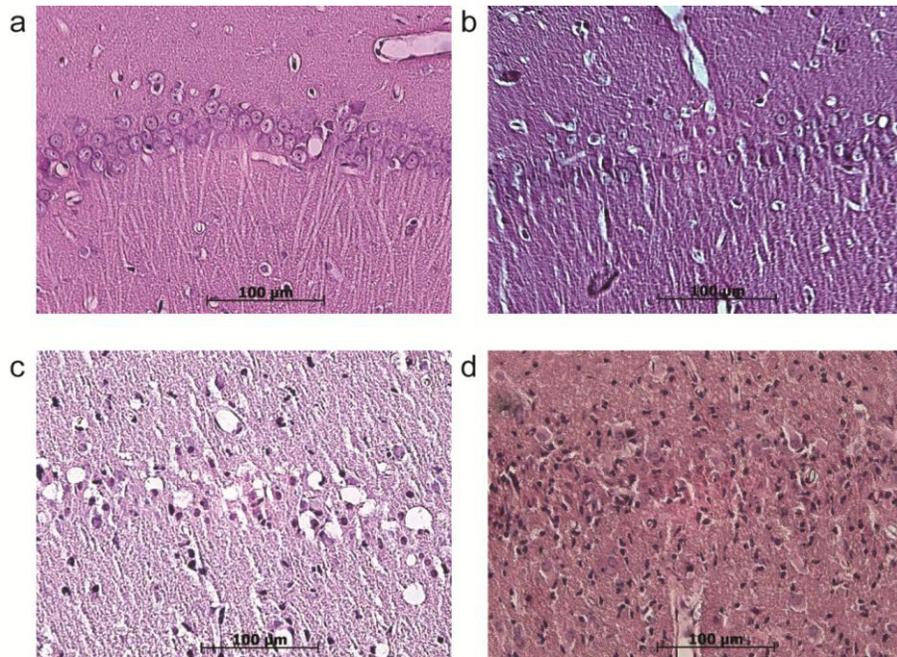


Figura 5. Escala de patrón morfológico. Se observan cuatro imágenes representativas a un aumento de 40x donde se observan las porciones intermedias de CA1 teñidas con hematoxilina y eosina para identificar los diferentes patrones morfológicos de daño en las neuronas de piramidales de CA1 caracterizado por reducción del tamaño neuronal (picnosis) y fragmentación del núcleo (cariorexis). (A) Escala de 0, sin daño neuronal; (B) Escala de 1, daño en algunas neuronas; (C) Escala de 2, daño en la mayoría de las neuronas; (D) Escala de 3, Daño en la totalidad de las neuronas. El daño se evaluó en las tres porciones del área CA1 una vez identificado que el daño tenía una calificación de 3 en la escala de daño morfológico.

Análisis estadístico del experimento 1.

Los datos obtenidos del experimento 1 fueron capturados en SPSS (v19.00) ® para Windows ®. Los gráficos fueron producidos utilizando el programa Graph Pad Prism v6 ®. Las comparaciones entre grupos y subgrupos respecto al desenlace posterior a la O4V se realizaron utilizando proporciones y pruebas no paramétricas (Chi-cuadrado). Las comparaciones entre grupos y subgrupos respecto a las escalas de daño y patrón morfológico fueron realizadas utilizando medias, rangos y pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney). Se estableció un nivel de significancia con una $p \leq 0.05$.

Experimento 2. Caracterización del desempeño funcional de ratas envejecidas en los protocolos de aprendizaje y memoria del LAM.

Animales de experimentación.

Dieciséis ratas Wistar macho fueron utilizadas en el experimento 2, ocho jóvenes (3-6 meses) y ocho envejecidas (18-21 meses). Las ratas fueron almacenadas en cajas plásticas con ciclos constantes de luz oscuridad con acceso a agua y alimento *ad libitum*. La temperatura (22°C) y humedad (60%) fueron mantenidas constantes. Los animales con mal estado general fueron excluidos del experimento. La edad, peso y talla fueron cuantificados antes del inicio de las pruebas (Tabla 3).

Grupo	Edad (meses)	Peso (g)	Longitud (cm)
Jóvenes	4 ± 1	398.4 ± 93.4	41.2 ± 1.1
Envejecidas	20 ± 1	760.1 ± 103.4	42.9 ± 1.8

Tabla 3. Edad y somatometría de las ratas jóvenes y envejecidas utilizadas en el experimento 2. Se muestra la edad, peso y talla de las ratas utilizadas en el experimento 2. Es notable la diferencia en la edad y peso de las ratas. Los valores representan la media ± la desviación estándar.

Protocolos del LAM.

Las ratas jóvenes y envejecidas fueron evaluadas en el LAM durante 12 días consecutivos. El laberinto de agua consiste en un estanque de 180 cm de diámetro y 60 cm de profundidad, llena de agua (23 ± 2 ° C) la cual se opacó con pintura tempera negra. El estanque estuvo rodeado en cada lado por cuatro cortinas blancas con figuras negras en cada una (círculo, cuadro, triángulo y cruz). El estanque fue dividido en octantes por medio de ocho ejes imaginarios (N, S, E, W, NE, NW, SE, SW) (Figura 7-A); una plataforma de salvamento de 15 cm de diámetro se escondió 2 cm debajo de la superficie del agua en una posición fija durante todos los protocolos de aprendizaje (eje NE), a mitad de la distancia entre la pared del estanque y el centro del estanque. Adicionalmente a los ocho ejes, el estanque se dividió en zonas circulares para facilitar el análisis de la estrategia de búsqueda (Figura 7-A).

Tres diferentes protocolos se realizaron durante el experimento: *pre-entrenamiento, aprendizaje y memoria*. 1) Protocolo de *Pre-entrenamiento*. Este protocolo se realizó en el día 0 para habitar a las ratas al agua del estanque. El pre-entrenamiento consiste en cuatro pruebas de 90 segundos cada una en las cuales la rata debe de nadar en el estanque hasta llegar a la plataforma central y visible; durante este protocolo no hubo señales en las cortinas. 2) Protocolo de aprendizaje. Este protocolo fue realizado en los días 1 a 5 y 7 a 11

después del protocolo de pre-entrenamiento para permitir a la rata aprender la localización de una plataforma fija y no visible. El protocolo de aprendizaje consiste en cuatro pruebas por día (90 segundos por cada una, con periodo inter prueba de 5 minutos), en los cuales la rata inició cada prueba desde cinco diferentes puntos de salida designados de forma pseudoaleatoria. La rata debía guiar su búsqueda en base a las señales localizadas en la periferia. Si la rata no localizaba la plataforma, esta fue colocada al final de los 90 segundos durante 30 segundos para permitirle la visualización de las señales y la identificación espacial de la plataforma. 3) Protocolo de memoria. Para este protocolo la plataforma fue removida del estanque. El protocolo de memoria consiste en 90 segundos en los cuales la rata debe de identificar la zona de la plataforma. Este protocolo fue realizado en los días 6 y 12 para evaluar la adquisición de memoria acerca de la localización de la plataforma.

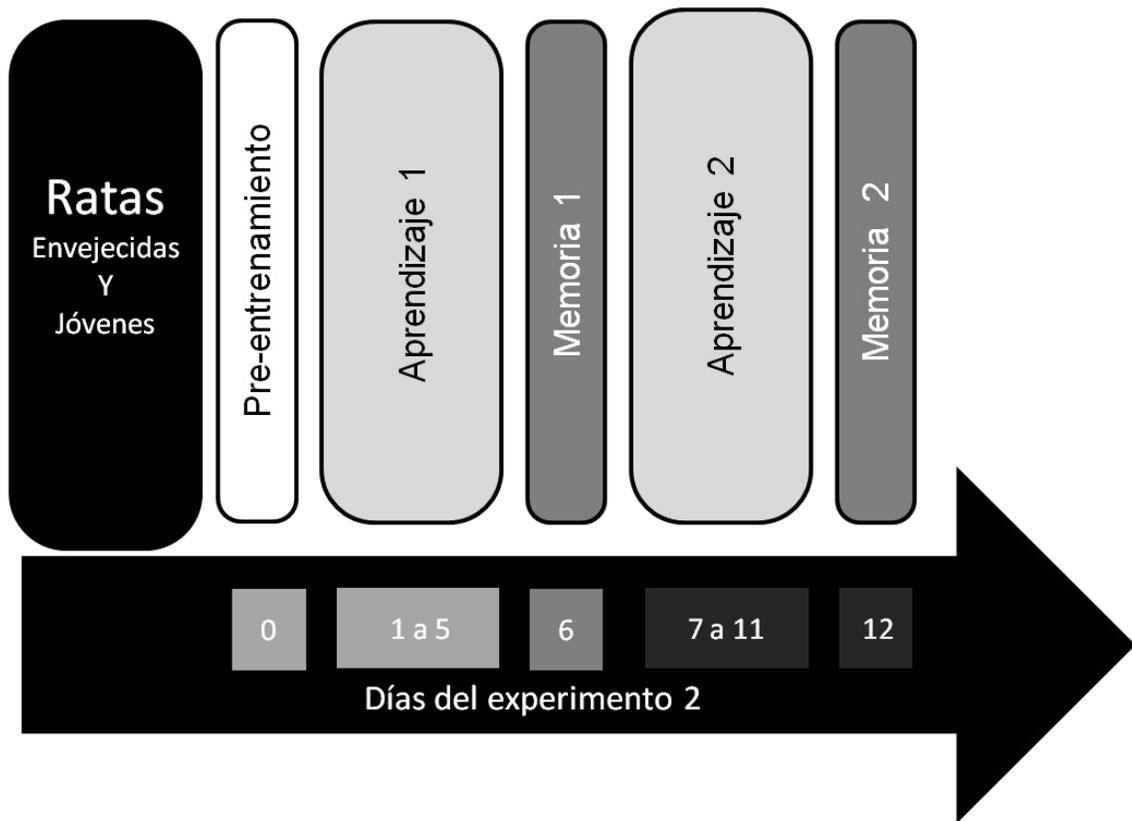


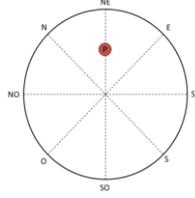
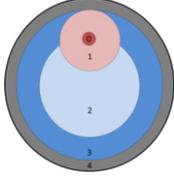
Figura 6. Diagrama representativo de la metodología utilizada en el experimento 2. Las evaluaciones se realizaron en 13 días consecutivos: 1 día de pre-entrenamiento, 10 días de protocolo de aprendizaje y 2 días de protocolo de memoria.

Métodos de evaluación.

Las variables tradicionales y grabación de los videos fueron realizados utilizando el sistema de grabación computarizado (ANY MAZE®). En el protocolo de pre-entrenamiento la llegada a la plataforma central y visible y la velocidad de nado fueron cuantificadas. En el protocolo de aprendizaje, la latencia a plataforma y distancia a plataforma también fueron cuantificadas. En el protocolo de memoria, el tiempo en el cuadrante correcto y los cruzamientos a plataforma fueron evaluados. La latencia y distancia hasta llegar al primer cruzamiento donde estaba la plataforma también fueron evaluadas en el protocolo de memoria de la misma manera como ocurrió en protocolo de aprendizaje.

El análisis de la estrategia de búsqueda en los protocolos de aprendizaje y memoria se realizó usando el Algoritmo para Estrategia de Búsqueda (AEB); un nuevo método propuesto por nuestro grupo de trabajo (Figura 7-B y 7-C). Este análisis se realizó por medio de dos observadores independientes cegados a la distribución de los grupos utilizando las grabaciones de video del sistema ANY Maze® y el AEB. Un tercer observador independiente se utilizó para decidir la clasificación de la estrategia de búsqueda en aquellas que resultaron discrepantes entre los primeros dos observadores. El AEB clasifica las estrategias de búsqueda dependiendo de la eficacia (llegada a la plataforma);

dirección/localización (estrategias directas hacia la zona de la plataforma) y la precisión de la estrategia (número de cambios en la trayectoria) (Figura 7-C). Las estrategias de búsqueda fueron clasificadas en una manera ordinal desde la más efectiva, directa y precisa (estrategia A) hasta la más inefectiva, no directa/no localizada y más imprecisa (estrategia J). El AEB también permite la distinción entre estrategias efectivas y directas (estrategias A, B, C y D) efectivas e indirectas (estrategias E, F y G) e inefectivas (estrategias H, I y J). Previamente al experimento los tres observadores fueron capacitados en el uso del AEB siguiendo las instrucciones que aparecen en la figura 7.

A. Descripción del Laberinto de Agua de Morris (LAM)		
El LAM consiste en un estanque circular 1.8 m de diámetro y 45 cm de profundidad lleno de agua. Se encuentra rodeado de 4 mamparas blancas. Cada mampara tiene una señal visual como única referencia (círculo, cuadrado, triángulo y cruz). El estanque está dividido en octantes y zonas.		
Octantes del LAM	Zonas del LAM	
<p>Los octantes se definen por 8 ejes correspondientes a los puntos cardinales (N, S, E, O, NE, NO, SE, SO).</p> <p>En la porción intermedia del eje NE se coloca durante todas las pruebas una plataforma de salvación sumergida 1 cm.</p>		<p>La división por zonas circulares facilita el uso del AEB.</p> <p>Las zonas son:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Plataforma 1. Periferia de la plataforma 2. Central del estanque 3. Periferia del estanque 4. Cercana a la pared del estanque
		
En cada prueba tiene una duración de 90 segundos. La rata inicia la búsqueda desde un punto de salida que varía de manera aleatoria entre cada prueba (no se utilizan los puntos más cercanos a la plataforma: NE, N y E). La prueba finaliza con la primera llegada a la plataforma (zona 0) o el cumplimiento de los 90 segundos.		

B. Cambios en la trayectoria de nado: Se identifican 3 tipos de cambio de trayectoria				
Utilizando la grabación de la prueba se procede a identificar el número de cambios en la trayectoria de nado. Se consideran como cambios en la trayectoria de nado los siguientes movimientos: trayectoria curva, movimientos sin sentido y trayectorias periféricas.				
Trayectoria Curva	Movimientos sin sentido		Trayectorias periféricas	
Cambio en la trayectoria con un ángulo de giro $\geq 45^\circ$ respecto a la trayectoria previa. El ángulo se cuantifica entre la trayectoria inicial (verde) y la trayectoria corregida (azul).	Trayectoria en espiral. No importa si cambia o no la trayectoria	Trayectoria en "S". No importa si cambia o no la trayectoria.	Nada dos o más octantes por la zona 3	Nada más de un octante por la zona 4
				

C. Algoritmo para de Estrategia de Búsqueda (AEB)									
Para clasificar la estrategia de búsqueda utilizando la grabación de la prueba se evalúa la efectividad, dirección inicial/localización y precisión									
1. Efectividad									
¿Llega a la zona 0 durante la prueba?									
Si					No				
Efectiva					Inefectiva				
2. Dirección inicial									
¿Llega a la zona 1 antes de cometer el primer cambio de trayectoria?									
Si					No				
Directa					Indirecta				
3. Precisión									
¿Cuántos cambios de trayectoria realiza hasta llegar a la zona 0?					¿Cuántos cambios de trayectoria realiza hasta llegar a la zona 0?				
Número de cambios de trayectoria					Número de cambios de trayectoria				
0	1-3	4-6	>6	1-3	4-6	>6	N	N	N
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
									

Figura 7. Instrucciones sobre la metodología del Algoritmo para Estrategia de Búsqueda. La metodología se describe en tres pasos: (A) Descripción del Laberinto de Agua de Morris, (B) Descripción de los cambios en la trayectoria, (C) Algoritmo para Estrategia de Búsqueda. Esta figura se utilizó como instructivo para la capacitación de los observadores que evaluaron los videos del experimento 2 y 3.

Análisis estadístico del experimento 2.

Todos los resultados fueron capturados en SPSS®. Para las mediciones tradicionales la media y el error estándar de la media (EEM) fue reportado y las diferencias entre los grupos de edad fueron comparados utilizando pruebas paramétricas según correspondiera (Prueba t de Student para muestras independientes y relacionadas o ANOVA con prueba post hoc de Bonferroni). La estrategia de búsqueda fue analizada por medio de un análisis de distribución de frecuencias y las comparaciones se realizaron por medio de pruebas no paramétricas (prueba de Chi cuadrado). Las comparaciones entre las clasificaciones de las estrategias de búsqueda entre los dos observadores se realizaron por medio de tablas de contingencia y cálculo del índice Kappa de Cohen. Se estableció un nivel de significancia con una $p \geq 0.05$.

Experimento 3. Análisis del deterioro funcional en el LAM secundario a daño morfológico en las neuronas piramidales del área CA1 en ratas envejecidas.

Animales de experimentación.

Sesenta y nueve ratas Wistar macho fueron utilizadas en el experimento 3, incluyendo 30 ratas jóvenes (3-6 meses) y 39 ratas envejecidas (18-21 meses). Todas las ratas fueron mantenidas en cajas plásticas bajo ciclos constantes de luz-obscuridad de 12 horas y con comida y agua *ad libitum*. La temperatura (22 ° C) y humedad (60%) fueron mantenidas constantemente. Los animales que mostraron mal estado general de salud fueron excluidos de los experimentos. La edad, peso, talla y glucosa basal fueron medidas antes y después de la inducción de ICGT (Tabla 4).

Grupo	Subgrupo	Edad (meses)	Peso (g)	Glucosa sanguínea antes de oclusión (mg/dl)	Glucosa sanguínea después de reperusión (mg/dl)
Jóvenes	No-Is	4.0 ± 1.0	388.1 ± 70.1	88.1 ± 10.4	86.0 ± 14.7
	In-Is	3.5 ± 1.0	425.3 ± 101.1	80.8 ± 17.5	143.0 ± 41.4
	Co-Is	4.6 ± 1.1	338.5 ± 154.6	85.3 ± 13.5	132.1 ± 37.6
Envejecidas	No-Is	20.2 ± 2.2	538.5 ± 89.8	74.5 ± 12.6	79.3 ± 21.2
	In-Is	22.0 ± 1.4	502.5 ± 105.4	67.0 ± 12.7	80.5 ± 26.2
	Co-Is	20.3 ± 1.7	604.4 ± 92.5	81.5 ± 6.9	116.2 ± 31.1

Tabla 4. Somatometría y glucosa sanguínea de las ratas jóvenes y envejecidas utilizadas en el experimento 3. Se muestra la edad, peso y talla de las ratas utilizadas en el experimento 3. Se muestra además la glucosa sanguínea pre y post reperusión de las ratas jóvenes y envejecidas con isquemia completa. Los valores representan media ± desviación estándar.

Inducción de ICG y evaluaciones funcional y morfológica.

Inicialmente a las ratas se les indujo el modelo de O4V para producir 15 minutos de ICG. Para este propósito se siguió la metodología descrita en el experimento 1 referente a la inducción de ICG por el modelo de O4V. Las ratas que sobrevivieron la reperusión fueron mantenidas en cajas hasta los 7 DPR para posteriormente iniciar la evaluación funcional siguiendo los protocolos de pre-entrenamiento, aprendizaje y memoria, descritos en el experimento 2. A los 21 DPR las ratas fueron infiltradas con paraformaldehído al 4% en PBS por medio de una técnica transcardiaca para obtener la muestra y procesarla de la misma manera como se describió en la metodología del experimento 1.

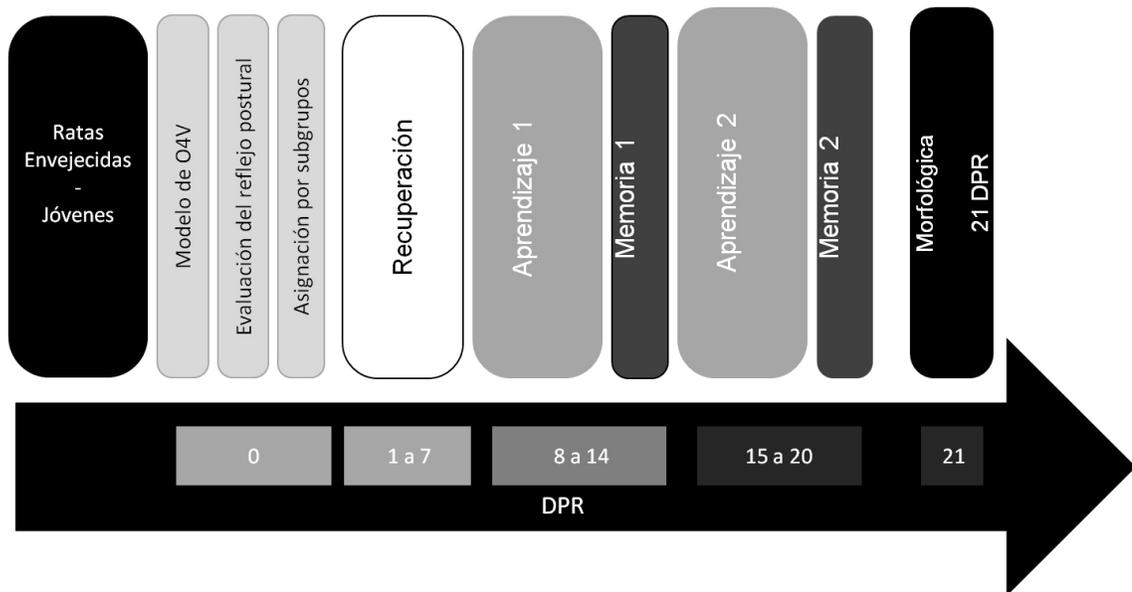


Figura 8. Esquema que muestra la metodología utilizada en el experimento

3. En las ratas jóvenes y envejecidas se llevó a cabo la misma metodología. Posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes en el segundo día del modelo de O4V se asignaron las ratas a los diferentes subgrupos en base a la preservación o pérdida parcial o total del reflejo postural. Las ratas que sobrevivieron el periodo de reperusión fueron evaluadas en los protocolos de pre-entrenamiento, aprendizaje y memoria del LAM. Finalmente el área CA1 del hipocampo fue evaluado a los 21 DPR utilizando las escalas de daño morfológico y patrón morfológico.

Análisis estadístico del experimento 3.

Los datos obtenidos del experimento 3 fueron capturados en SPSS (v19.00) ® para Windows. Los gráficos fueron producidos utilizando el programa Graph Pad Prism v6 ®. Las comparaciones entre grupos y subgrupos respecto al desenlace posterior a la O4V se realizaron utilizando proporciones y pruebas no paramétricas (Chi-cuadrado). Las comparaciones entre grupos y subgrupos respecto a las escalas de daño y patrón morfológico fueron realizadas utilizando medias y rangos y pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney). Se estableció un nivel de significancia con una $p \leq 0.05$.

Apego a las recientes recomendaciones para el desarrollo de proyectos de investigación básica sobre isquemia cerebral.

La metodología utilizada en este estudio fue realizada con el propósito de resolver la discrepancia del factor edad en la investigación sobre isquemia cerebral, por medio de la caracterización del daño morfológico y deterioro funcional producido por 15 minutos de ICG en ratas envejecidas por medio del modelo de O4V. Para apearse a las recomendaciones internacionales sobre la ejecución de proyectos experimentales relacionados con isquemia cerebral (2) se hacen las siguientes aclaraciones metodológicas. En cuanto a la asignación aleatoria de los sujetos, se debe comentar que en nuestros experimentos la distribución se realizó de un modo aleatorio debido a que la asignación por grupo y subgrupo dependió de la edad de los individuos (grupos envejecido y joven) y el desenlace posterior a la oclusión de las arterias carótidas durante el segundo día del modelo (subgrupos: isquemia-completa, isquemia-incompleta y no-isquemia), respectivamente.

Respecto a las evaluaciones cegadas; estas se realizaron en el análisis morfológico por medio de un observador cegado a la distribución de los grupos y subgrupos y en los experimentos 2 y 3 por medio de tres observadores cegados a la distribución de grupos y subgrupos.

En cuanto al uso de un grupo control; el objetivo del presente proyecto está encaminado a la caracterización de un modelo y sus métodos de evaluación, describiendo también el espectro de desenlace. Se sugiere que para posteriores proyectos las ratas aleatoriamente asignados al grupo no-isquemia pueden ser utilizadas como un grupo sham-control ya que clínicamente no tuvieron isquemia y los dispositivos se retiraron inmediatamente después de la colocación. Por último el tamaño de la muestra fue designado en base a disponibilidad de los sujetos de experimentación.

RESULTADOS

Experimento 1. Análisis del daño morfológico en las neuronas piramidales del área CA1 secundario a 15 minutos de ICG por O4V en ratas envejecidas.

Desenlace posterior a la O4V respecto a la asignación por subgrupos posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes y la mortalidad por subgrupo.

El experimento morfológico incluyó un total de 22 ratas jóvenes y 26 ratas envejecidas. El desenlace posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes es reportado en la Tabla 5. El desenlace respecto a la asignación por subgrupos posterior a la oclusión carotidea bilateral no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p = 0.628$). A este respecto la diferencia más notable se identifica en un ligero aumento en la proporción de ratas envejecidas con isquemia-incompleta. El desenlace respecto a la mortalidad no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p = 0.229$); sin embargo se evidenció una mayor mortalidad en el subgrupo envejecido isquemia-completa ($p = 0.375$ vs 0.579 , jóvenes vs envejecidas, respectivamente). Debe mencionarse que no se registraron muertes en los subgrupos no-isquemia e isquemia-incompleta de ratas jóvenes y envejecidas.

Subgrupo	Desenlace posterior a la oclusión carotídea bilateral	Grupo joven N=22	Grupo envejecido N=26
Co-Is	Perdió el reflejo postural entre los 0 y 60 segundos posterior a la reperfusión	16/22 (0.727)	19/26 (0.731)
		Sobrevivieron hasta el día de la evaluación: 10/16 (0.625) # Murieron durante la isquemia: 4/16 (0.250) # Murieron durante la reperfusión: 2/16 (0.125)	Sobrevivieron hasta el día de la evaluación: 8/19 (0.421) # Murieron durante la isquemia: 7/19 (0.368) # Murieron durante la reperfusión: 4/19 (0.211)
In-Is	Perdió el reflejo postural entre los 0 y 60 segundos posterior a la reperfusión pero lo recuperan durante el tiempo de isquemia	0/22 (0.000)	1/26 (0.038)
No-Is	No perdieron el reflejo postural	6/22 (0.272)	6/26 (0.231)

Tabla 5. Desenlace posterior a la O4V en el experimento 1. El desenlace posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes en el segundo día del modelo de O4V en ratas jóvenes y envejecidas se valoró en base a la asignación por subgrupos y la mortalidad por subgrupo. Co-Is, isquemia-completa; In-Is, isquemia-incompleta; No-Is, no-isquemia. Los valores se presentan como proporciones. # Ratas excluidas del análisis morfológico.

Análisis del daño morfológico en el área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas.

El daño morfológico en los subgrupos de ratas jóvenes y envejecidas fue evaluado a los 4, 7 y 14 DPR utilizando la escala de daño morfológico (Figuras 9 y 10). En los subgrupos joven y envejecido isquemia-completa se identificó que el daño morfológico se extendió hasta la porción lateral de CA1 (daño morfológico grado 3) en la totalidad de los sujetos evaluados a los 4, 7 y 14 DPR; sin existir diferencias entre jóvenes y envejecidos. En los subgrupos joven y envejecido no-isquemia se identificó la ausencia de daño morfológico en CA1 (daño morfológico grado 0) en la totalidad de los sujetos evaluados a los 4, 7 y 14 DPR; sin existir diferencias entre jóvenes y envejecidas. Una rata envejecida se asignó al subgrupo isquemia-incompleta y fue evaluada al 7 DPR encontrándose daño morfológico incompleto (daño morfológico grado 1.5), es decir presencia de daño morfológico hasta la porción lateral de CA1 en un hemisferio y ausencia de daño en CA1 en el hemisferio contralateral.

Estos resultados indican que en los subgrupos isquemia-completa 15 minutos de O4V produjeron daño morfológico completo en ratas jóvenes y envejecidas a los 4, 7 y 15 DPR. Además que la oclusión transitoria (menor de 90 segundos) en las ratas jóvenes y envejecidas asignadas como no-isquemia no producen daño morfológico en las neuronas piramidales del hipocampo CA1 a los 4, 7 y

14 DPR. También se identificó que la pérdida parcial del reflejo postural en ratas envejecidas es un indicador clínico de daño morfológico incompleto.

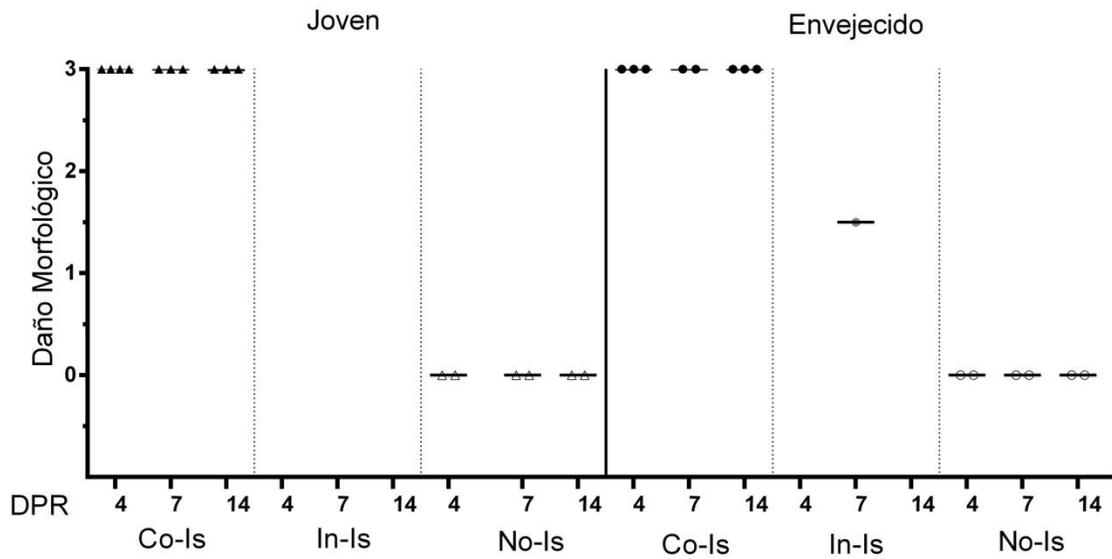


Figura 9. Análisis morfológico en base a la escala de daño morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 1.

Se observa la distribución de las ratas jóvenes y envejecidas asignadas a los subgrupos isquemia completa (Co-Is), isquemia-incompleta (In-Is) y no-isquemia (No-Is). Cada figura representa una rata. La línea horizontal representa la media de cada subgrupo calculada en base al daño morfológico de cada rata.

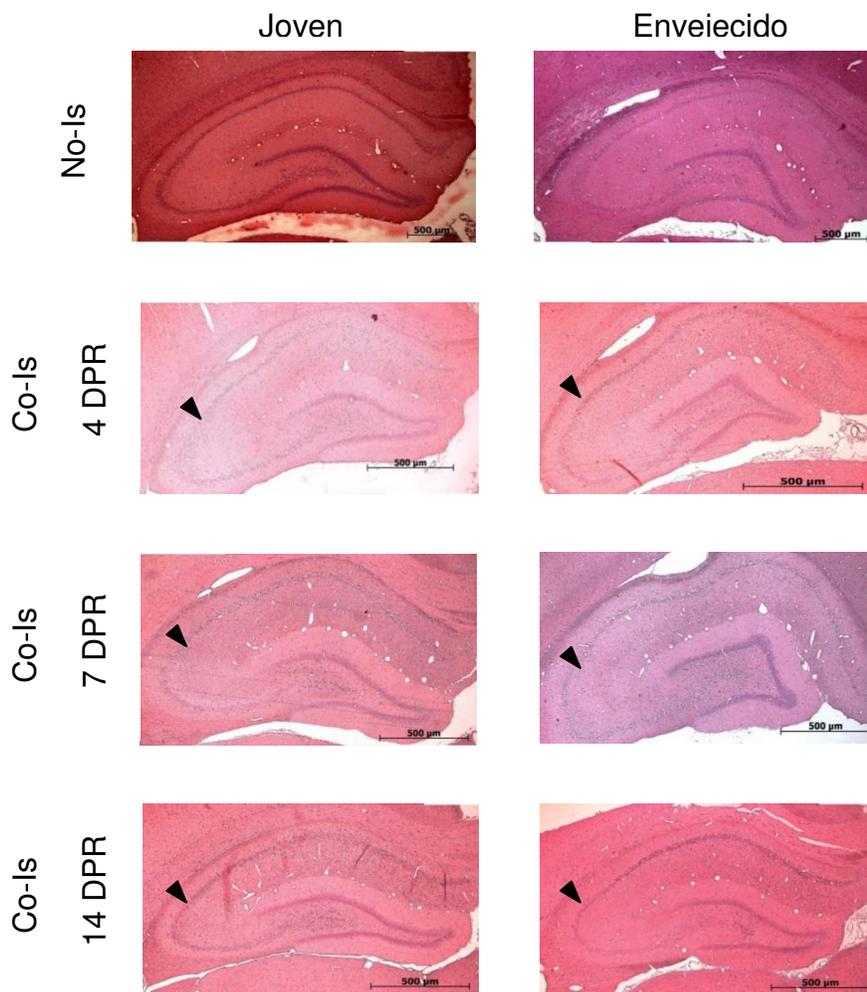


Figura 10. Daño morfológico en el área CA1 del hipocampo de ratas

jóvenes y envejecidas. Se observan fotomicrografías panorámicas de cortes del área CA1 del hipocampo teñidos con Hematoxilina y Eosina para evaluar el daño morfológico. Grupo joven. Grupo envejecido. (No-Is) no-isquemia, (Co-Is) isquemia-completa. Evaluaciones a los 4, 7 y 14 DPR. La cabeza de flecha indica el sitio más lateral donde se identificó el daño neuronal (picnosis y cariorrexis).

Análisis del patrón morfológico en el área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas.

El patrón morfológico fue evaluado en los subgrupos de las ratas jóvenes y envejecidas a los 4, 7 y 14 DPR (Figuras 11 y 12). En las ratas jóvenes isquemia-completa se observaron distintos patrones morfológicos en los días de evaluación. A los 4 DPR en 2/4 de las ratas se identificó la totalidad de las neuronas dañadas (patrón de daño grado 3), mientras que el resto de las ratas se identificó daño en la mayoría de las neuronas (patrón de daño grado 2). A los 7 DPR en la totalidad de las ratas (3/3) se identificó daño en la totalidad de las neuronas. A los 14 DPR en 2/3 de las ratas se identificó daño en la totalidad de las neuronas, mientras que en 1/3 se identificó daño en la mayoría de las neuronas. Por otra parte en las ratas envejecidas isquemia-completa se identificó patrón de daño con afectación de la totalidad de las neuronas en todas las ratas de los tres días de evaluación. Las diferencias observadas entre los subgrupos joven y envejecida isquemia completa resultaron no significativas ($p=0.180$).

Por otra parte, la totalidad las ratas jóvenes y envejecidas de los subgrupos no-isquemia evaluadas a los 4, 7 y 14 DPR presentaron un patrón morfológico sin afectación de neuronas (patrón morfológico grado 0). En la rata envejecida asignada al subgrupo isquemia-incompleta y evaluada al 7 DPR se identificó patrón morfológico con afectación incompleto de las neuronas (patrón

morfológico 1.5), caracterizado por patrón morfológico de la totalidad de las neuronas dañadas en un hemisferio y ninguna neurona dañada en el hemisferio contralateral.

Estos resultados indican que en las ratas envejecidas del subgrupo isquemia-completa 15 minutos de O4V producen patrón un morfológico con afectación de la totalidad de las neuronas a los 4, 7 y 14 DPR; mientras que en las ratas jóvenes del subgrupo isquemia-completa se produce un patrón morfológico variable afectando la mayoría o la totalidad de las neuronas de CA1 a los 4 y 14 DPR. Además se identificó que en las ratas jóvenes y envejecidas del subgrupo no-isquemia 90 segundos de O4V producen un patrón morfológico de con ausencia de daño en las neuronas de CA1.

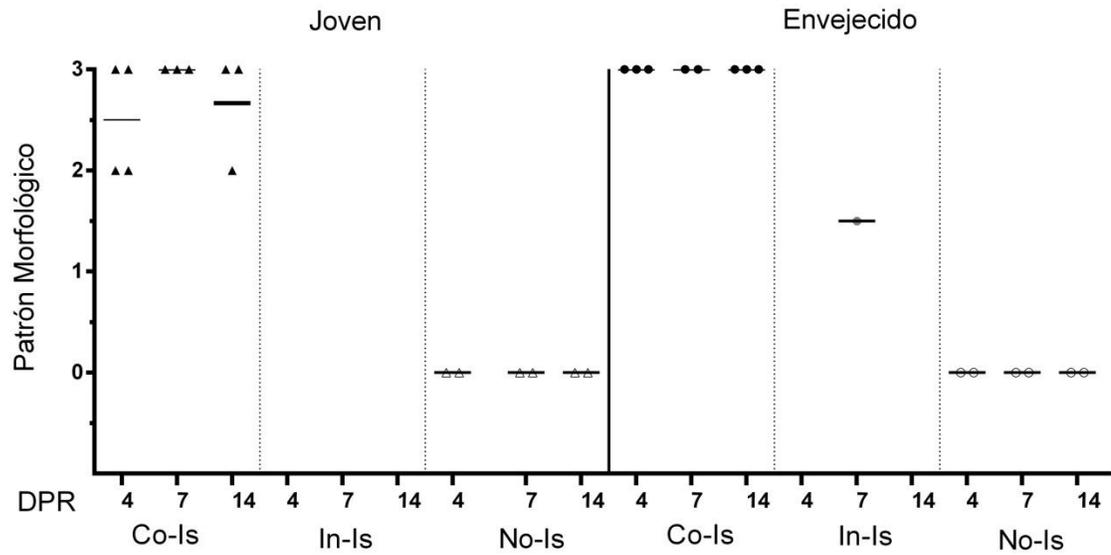


Figura 11. Análisis morfológico en base al patrón de daño morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 1.

Se observa la distribución de las ratas jóvenes y envejecidas asignadas a los subgrupos isquemia completa (Co-Is), isquemia-incompleta (In-Is) y no-isquemia (No-Is). Cada figura representa una rata. La línea horizontal representa la media de cada subgrupo calculada en base al daño morfológico de cada rata.

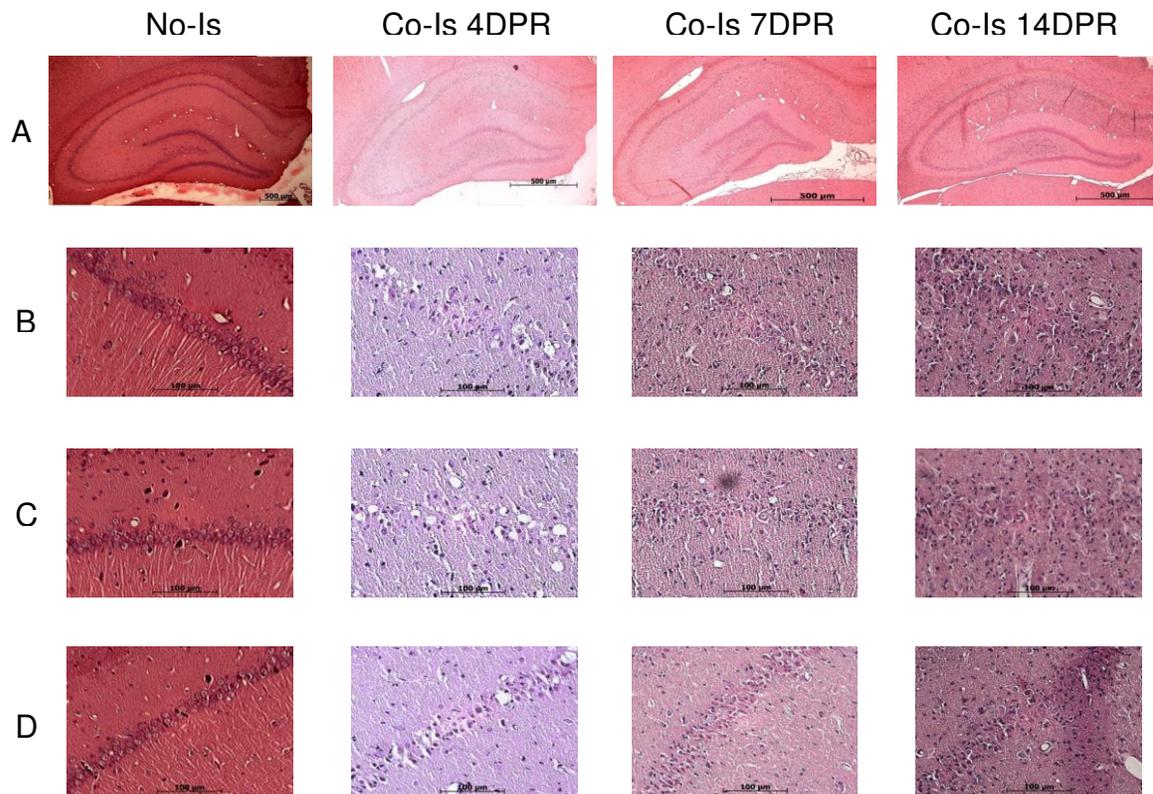


Figura 12. Patrón morfológico en el área CA1 del hipocampo de ratas jóvenes. Se observan fotomicrografías panorámica y a mediano aumento de cortes del área CA1 del hipocampo teñidos con Hematoxilina y Eosina para evaluar el patrón morfológico. (A) Hipocampo CA1 en visión panorámica. (B) Porción medial del hipocampo CA1. (C) Porción intermedia del hipocampo CA1. (D) Porción lateral del hipocampo CA1. Las columnas indican los subgrupos (No-Is) no-isquemia, (Co-Is) isquemia-completa. Evaluaciones a los 4, 7 y 14 DPR. Los recuadros de las imágenes panorámicas indican los sitios de evaluación de las imágenes a mayor aumento. En las imágenes a mayor aumento se identifica daño morfológico de las neuronas piramidales caracterizado por la presencia de picnosis y cariorrhexis.

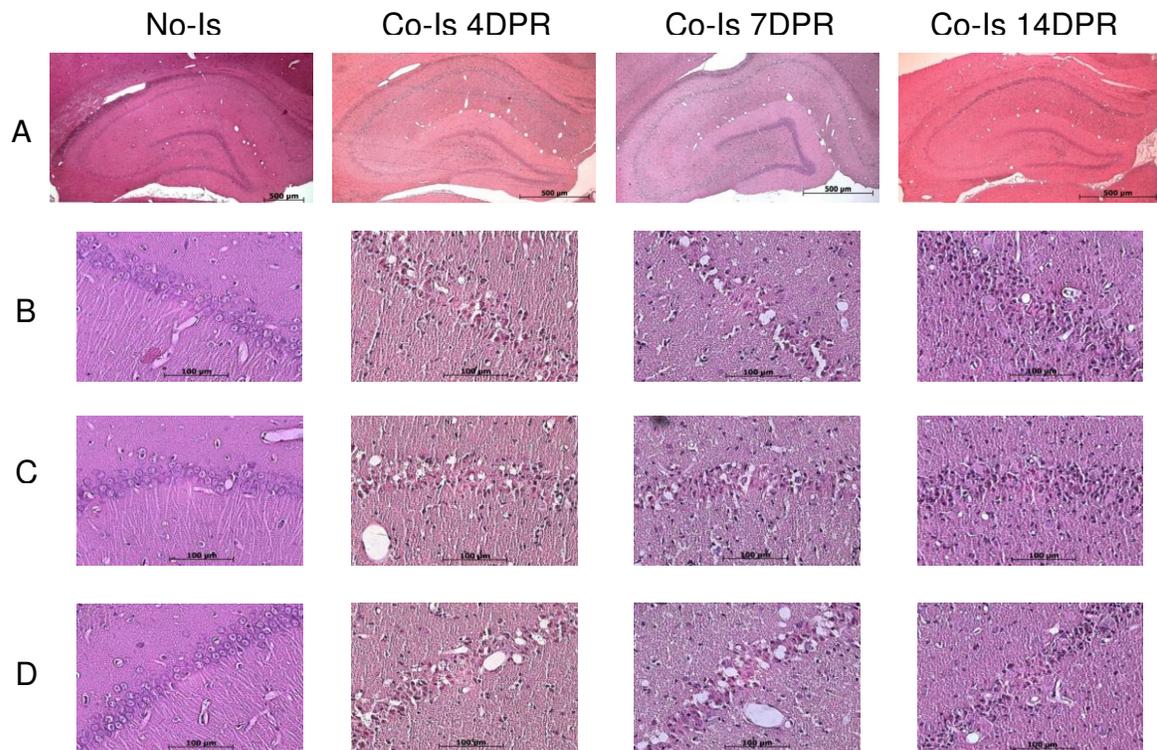


Figura 13. Patrón morfológico en el área CA1 del hipocampo de ratas envejecidas. Se observan fotomicrografías panorámica y a mediano aumento de cortes del área CA1 del hipocampo teñidos con Hematoxilina y Eosina para evaluar el patrón morfológico. (A) Hipocampo CA1 en visión panorámica. (B) Porción medial del hipocampo CA1. (C) Porción intermedia del hipocampo CA1. (D) Porción lateral del hipocampo CA1. Las columnas indican los subgrupos (No-Is) no-isquemia, (Co-Is) isquemia-completa. Evaluaciones a los 4, 7 y 14 DPR. Los recuadros de las imágenes panorámicas indican los sitios de evaluación de las imágenes a mayor aumento. En las imágenes a mayor aumento se identifica daño morfológico de las neuronas piramidales caracterizado por la presencia de picnosis y cariorexis.

Experimento 2. Caracterización del desempeño funcional de ratas envejecidas en los protocolos de aprendizaje y memoria del LAM.

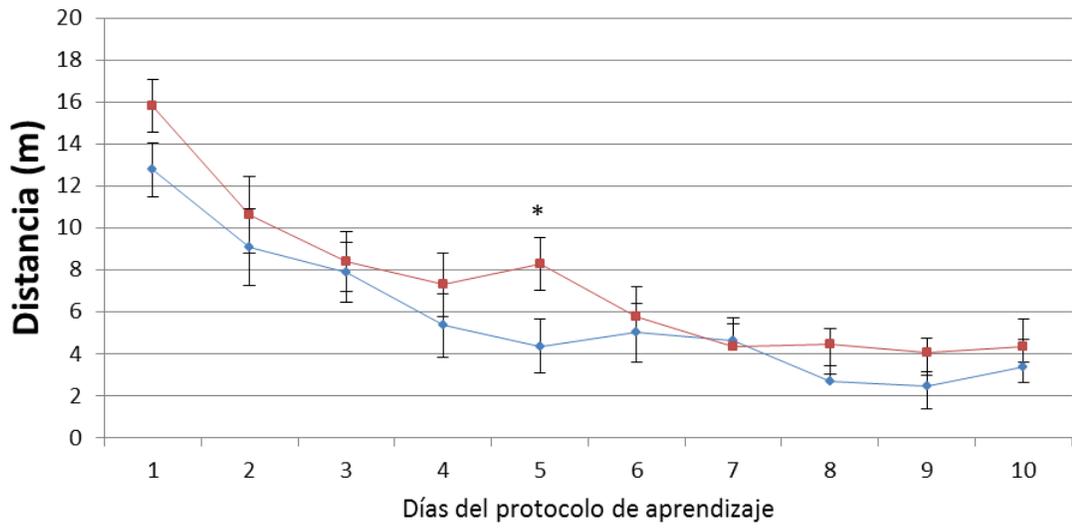
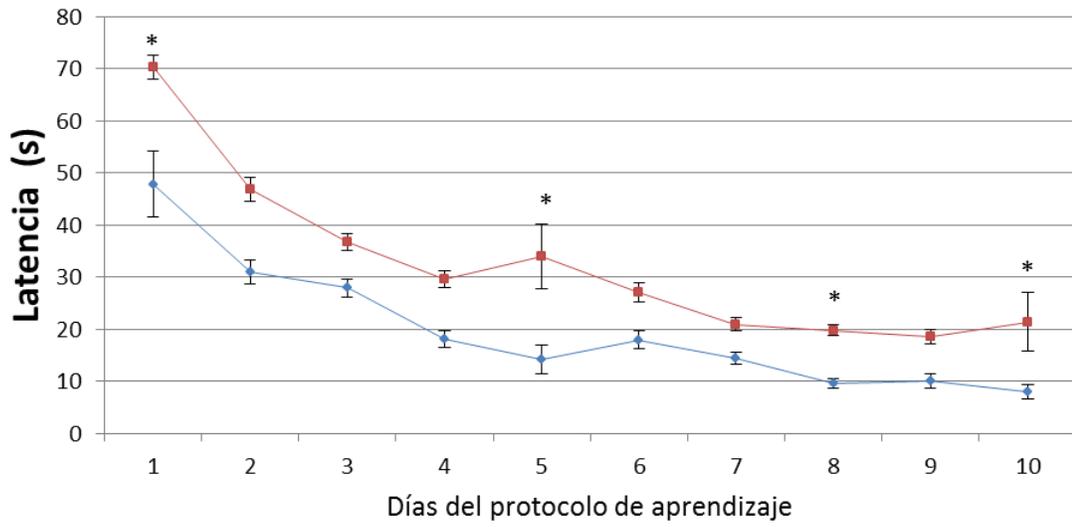
Con el propósito de caracterizar el desempeño funcional de ratas jóvenes y envejecidas durante los protocolos de aprendizaje y memoria en el LAM, se utilizaron mediciones tradicionales y análisis de estrategia de búsqueda.

Mediciones tradicionales en el protocolo de aprendizaje en las ratas jóvenes y envejecidas.

En el protocolo de aprendizaje se midieron la latencia y la distancia a plataforma (Figura 14). La latencia a plataforma mostró una disminución progresiva en los dos grupos a medida que avanzaban los días de entrenamiento. Las ratas envejecidas tuvieron latencias mayores a las registradas en animales jóvenes en todos los días de entrenamiento, existiendo diferencias significativas a los 5, 8 y 10 días de entrenamiento. A medida que avanzaban los días de entrenamiento, la distancia a plataforma también mostró una disminución progresiva en ambos grupos de edad, aunque las diferencias registradas entre ratas jóvenes y envejecidas fueron más estrechas que las observadas en la latencia, existiendo diferencia significativa únicamente en el día 5 de entrenamiento.

La disminución progresiva de la latencia y distancia a la plataforma se interpreta como un proceso de aprendizaje exitoso en ambos grupos ya que los registros del primer día mostraron diferencias significativas con los registros del quinto y décimo día de entrenamiento (Tabla 6).

Los anteriores resultados muestran que en ambos grupos se documenta el proceso de aprendizaje, el cual es confirmado a través de pruebas de memoria. Además se identifica que las ratas envejecidas tienen un desempeño funcional diferente al de las ratas jóvenes, caracterizado por latencias y distancias más prolongadas para encontrar la plataforma.



■ Joven ■ Envejecido

Figura 14. Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de aprendizaje del experimento 2. Se evaluó la latencia y distancia a plataforma en ratas jóvenes y envejecidas durante los 10 días del protocolo de aprendizaje. Se observa una disminución progresiva de ambas mediciones en ambos grupos. Se reporta la media \pm error típico de la media. La comparación entre jóvenes y envejecidos se realizó por medio de ANOVA, las diferencias significativas ($p > 0.05$) se señalan con (*).

Medición	Día de entrenamiento	Jóvenes	Envejecidas
Latencias	1	47.831 ± 6.272	70.184 ± 6.949
	5	14.240 ± 2.774 *	33.925 ± 5.830 *
	10	7.956 ± 1.062 *	21.356 ± 5.753 *
Distancias	1	12.766 ± 1.226	15.812 ± 1.304
	5	4.355 ± 1.050 *	8.281 ± 1.473*
	10	3.351 ± 1.524 *	4.324 ± 1.083*

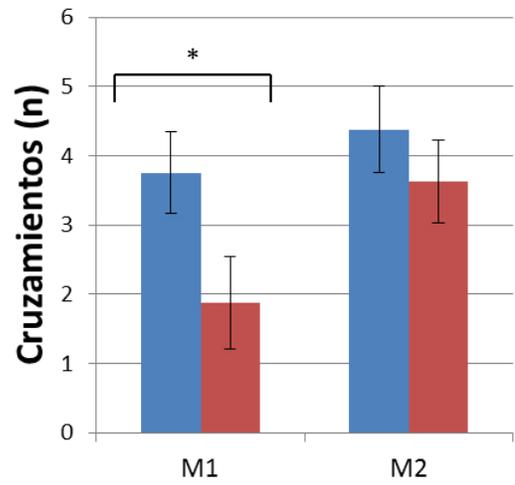
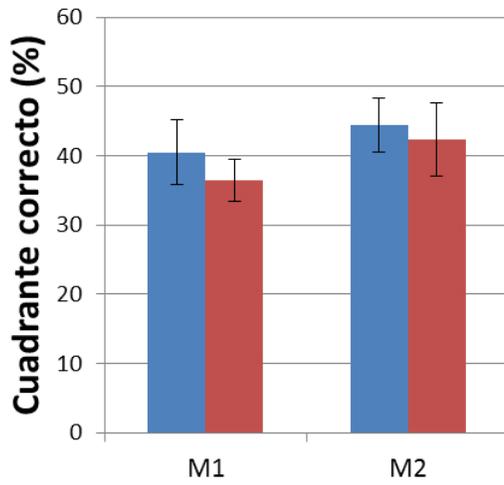
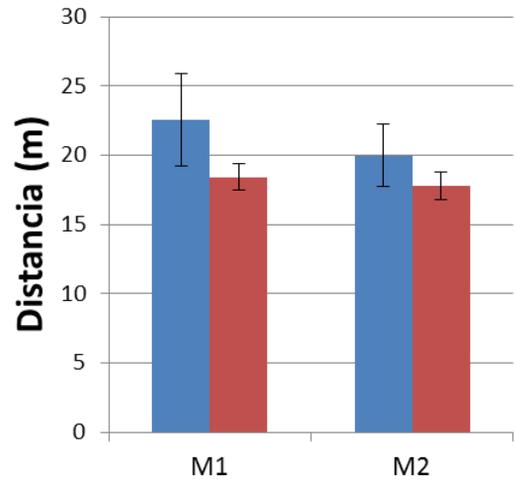
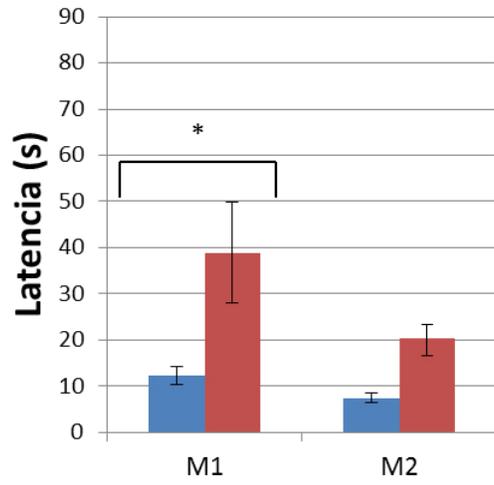
Tabla 6. Latencias y distancias a la plataforma a los 1, 5 y 10 días del protocolo de aprendizaje en ratas jóvenes y envejecidas. Se reporta la media ± error típico de la media. Se compararon del 5º y 10º día respecto al 1º utilizando la prueba T Student para muestras relacionadas. (*) Muestra una $p \leq 0.05$.

Mediciones tradicionales en el protocolo de memoria en las ratas jóvenes y envejecidas.

El análisis de las mediciones tradicionales en el primer y segundo protocolo de memoria (latencia a plataforma, distancia a plataforma, tiempo en el cuadrante correcto y número de cruzamientos sobre la zona de la plataforma) mostró diferencias entre los grupos (Figura 15). Durante el primer protocolo de memoria se observaron diferencias significativas entre grupos en la latencia hasta la primer llegada a la zona de la plataforma y el número de cruzamientos sobre la zona de la plataforma ($p < 0.05$), indicando que las ratas envejecidas utilizan latencias más largas e insisten menos sobre la zona de la plataforma o bien la cruzan en algunas ocasiones por situación de azar. En el primer protocolo de memoria, la distancia a plataforma y el porcentaje de tiempo invertido en el cuadrante correcto tuvo menores diferencias que no lograron significancia estadística ($p > 0.05$). Con estos resultados se interpreta que en las ratas envejecidas cinco días de entrenamiento en el protocolo de aprendizaje no son suficientes para evidenciar la adquisición de memoria al mismo grado que en las ratas jóvenes.

En el segundo protocolo de memoria realizado posteriormente al décimo día de entrenamiento no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de edad en ninguna de las variables tradicionales analizadas. Esto es explicado porque el grupo envejecido disminuyó su latencia a plataforma e

incrementó el número de cruzamientos en la zona de la plataforma mientras que las ratas jóvenes ligeramente mejoraron su desempeño. Con estos resultados se interpreta que son necesarios 10 días de entrenamiento en el protocolo de aprendizaje para que las ratas envejecidas adquieran un desempeño en el protocolo de aprendizaje sin diferencias respecto a las ratas jóvenes.



Joven

Envejecido

Figura 15. Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de memoria del experimento 2. Se evaluó la latencia, distancia, tiempo en el cuadrante correcto y cruzamientos a la zona de la plataforma. Se reporta la media \pm error típico de la media de ratas jóvenes (azul) y envejecidas (rojo) de las distintas mediciones. Las comparaciones entre grupos y entre pruebas se realizaron utilizando la prueba T de Student para muestras independientes y relacionadas respectivamente. Los valores de $p \leq 0.05$ se indican con (*).

Propuesta y estandarización de un algoritmo para el análisis de la estrategia de búsqueda (AEB).

Con el fin de proponer el análisis de la estrategia de búsqueda como un indicador del proceso de aprendizaje y adquisición de memoria, primeramente se analizaron los videos de todas las ratas jóvenes y envejecidas. Posteriormente a este análisis, identificamos los tres principales aspectos que caracterizan a la estrategia de búsqueda utilizada por cada rata en cada prueba identificando: eficiencia, direccionalidad/localización y precisión. Además, se identificó que durante el proceso de aprendizaje las ratas jóvenes y envejecidas mejoran su estrategia de búsqueda pasando de estrategias inefectivas, no localizadas e imprecisas hacia estrategias efectivas, directas y de mayor precisión.

Fundamentado en las anteriores observaciones se diseñó un algoritmo basado en parámetros para designar la estrategia de búsqueda en diez posibles clasificaciones ordinales (Figura 7). Para estandarizar el uso del algoritmo y evitar sesgos de interpretación, se entrenó a los observadores hasta alcanzar un excelente índice de variabilidad inter-observador para la eficiencia y direccionalidad/localización (*Índice Kappa de Cohen = 1.0*) y un buena índice de variabilidad inter-observador para la precisión y clasificación (*Índice Kappa de Cohen = 0.845*).

Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje.

El análisis de la estrategia de búsqueda utilizada durante el protocolo de aprendizaje mostró que en ambos grupos se observa una mejoría progresiva de la estrategia utilizada. Sin embargo no se observa el mismo patrón de mejoría entre los dos grupos de edad.

Las ratas jóvenes iniciaron el entrenamiento con estrategias eficientes e indirectas en la mayoría de las veces y posteriormente mejoraron al incrementar sus estrategias efectivas y directas, para finalmente incrementar la precisión de la búsqueda. Las ratas envejecidas iniciaron con estrategias con un mayor número de estrategias inefectivas, las cuales para el segundo día de entrenamiento se tornaron efectivas e indirectas, para finalmente aumentar la precisión de las estrategias indirectas pero aumentando muy poco el número de estrategias directas. De esta manera el desempeño de las ratas envejecidas en cuanto a la estrategia de búsqueda no alcanzó el nivel de las ratas jóvenes.

Las diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos se observaron a partir del día 4 de entrenamiento y estas persistieron hasta el día 10, con excepción del día 6 ($p < 0.05$). Estos resultados indicaron que el análisis de la estrategia de búsqueda utilizando el AEB es un método efectivo y

reproducibile para evidenciar el proceso de aprendizaje en ratas jóvenes y envejecidas. Sin embargo debe considerarse que las ratas envejecidas mejoraron su estrategia de búsqueda utilizando estrategias indirectas, mientras que las ratas jóvenes prefieren estrategias directas.

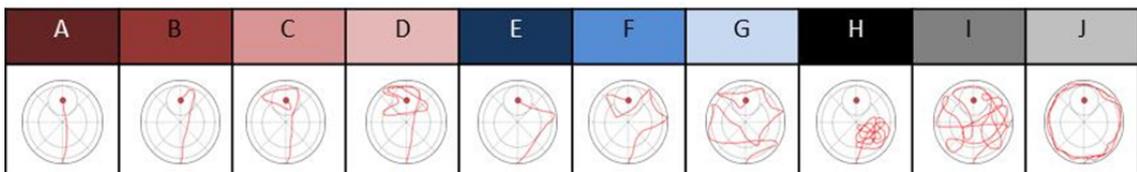
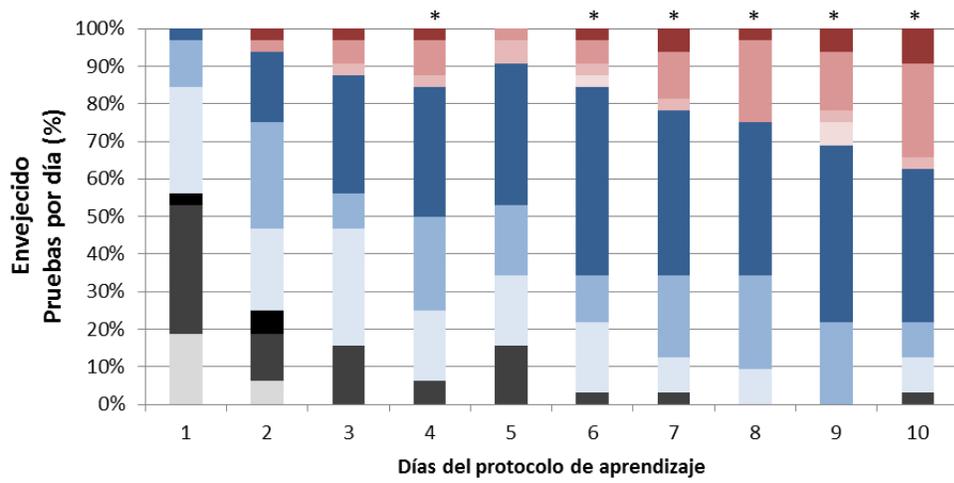
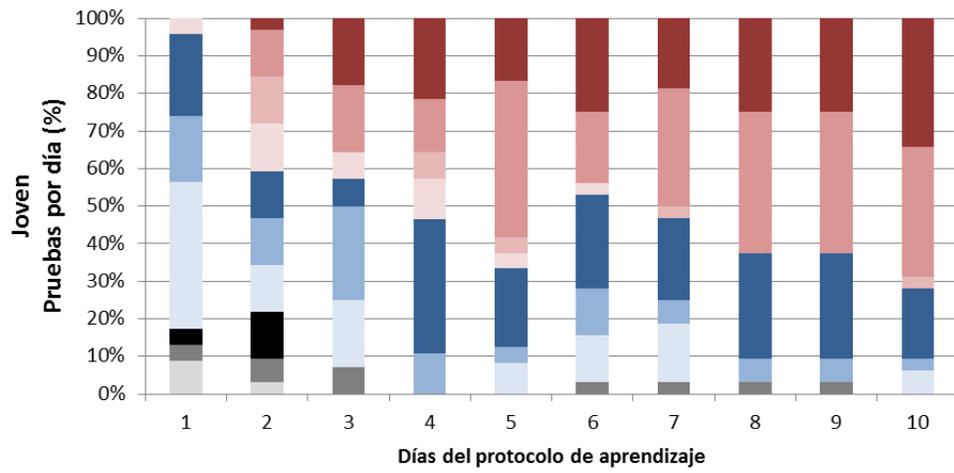


Figura 16. Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje del experimento 1. La estrategia de búsqueda se analizó utilizando el AEB. Se reportan los resultados utilizando distribución de frecuencias por día de entrenamiento. Se realizó la comparación entre grupos utilizando la prueba de Chi Cuadrada. Los valores con $p \leq 0.05$ se muestran con (*). Se observa una progresión a la mejoría de la estrategia de búsqueda utilizada en ambos grupos, sin embargo las ratas jóvenes utilizan principalmente estrategias directas (colores rojos), mientras que las envejecidas utilizan principalmente estrategias indirectas (colores azules).

Análisis de la estrategia de búsqueda en los protocolos de memoria.

Durante el protocolo de memoria se identificaron diferencias entre ratas jóvenes y envejecidas (Figura 17). En el primer protocolo de memoria las ratas envejecidas fueron diferentes que las jóvenes; sin embargo estas diferencias no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Al igual que en los primeros cinco días del entrenamiento, el desempeño en la primera prueba de memoria mostró que las ratas envejecidas utilizan preferentemente estrategias indirectas mientras que las jóvenes utilizan estrategias directas. En el segundo protocolo de memoria el desempeño de las ratas envejecidas mejoró notablemente al incrementar el número de estrategias directas, de este modo las diferencias entre grupos joven y envejecido fueron menos evidentes.

Estos resultados indican que las ratas envejecidas modifican gradualmente su estrategia de búsqueda, llegando incluso a tener una estrategia similar a la utilizada por ratas jóvenes en la segunda prueba de memoria; requiriendo diez días de entrenamiento para tener un desempeño similar al de las ratas jóvenes. Adicionalmente estos resultados también indican que el análisis de estrategia de búsqueda utilizando el AEB resulta como un método adecuado para evaluar la adquisición de memoria y clasificar la estrategia de búsqueda inicial de las ratas. Adicionalmente se recomienda utilizar en estos protocolos mediciones como el número de cruzamientos y el porcentaje de tiempo en el cuadrante

correcto con el fin de evaluar la insistencia por encontrar la plataforma no existente.

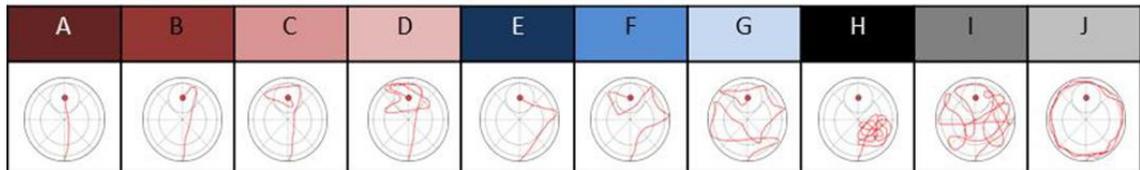
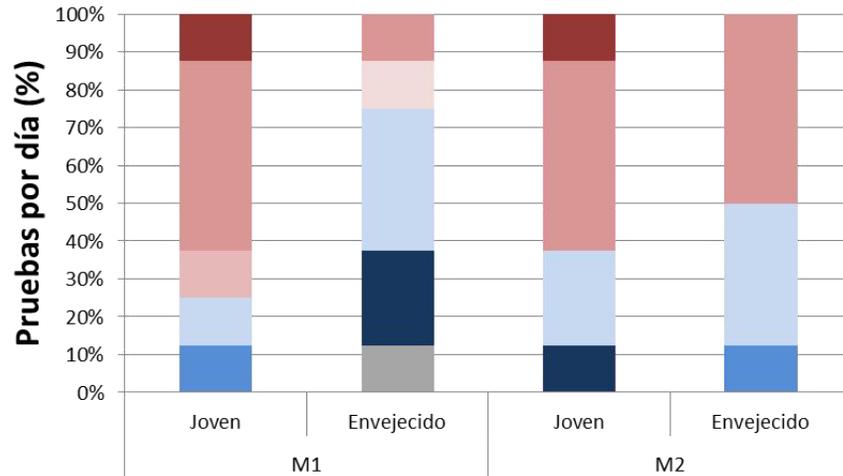


Figura 17. Análisis de estrategia de búsqueda en los protocolos de memoria del experimento 1. La estrategia de búsqueda se analizó utilizando el AEB. Se realizó la comparación entre grupos utilizando la prueba de Chi Cuadrada. Los valores con $p \leq 0.05$ se muestran con (*). Se observa una progresión a la mejoría de la estrategia de búsqueda utilizada en el grupo envejecido. El grupo joven aparenta tener un ligero retroceso el cual no fue significativo. Se observan que las ratas jóvenes utilizan principalmente estrategias directas (colores rojos), mientras que las envejecidas utilizan principalmente estrategias indirectas (colores azules).

Experimento 3. Análisis del deterioro funcional en el LAM secundario a daño morfológico en las neuronas piramidales del área CA1 en ratas envejecidas.

Desenlace posterior a la O4V respecto a la asignación por subgrupos posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes y la mortalidad.

El experimento 3 incluyó un total de 69 ratas Wistar macho, 30 ratas jóvenes y 39 ratas envejecidas. El desenlace posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes es reportado en la Tabla 5 por medio de proporciones. El desenlace respecto a la asignación por subgrupos posterior a la oclusión carotidea bilateral no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p = 0.487$). La principal diferencia en la asignación por subgrupos fue un aumento no significativo en la proporción de ratas jóvenes con isquemia-incompleta. El desenlace respecto a la mortalidad en el experimento 3 tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos joven y envejecido isquemia-completa ($p = 0.001$); evidenciado por un importante aumento en la mortalidad de las ratas envejecidas isquemia-completa alcanzando un nivel cuatro veces mayor al de las ratas jóvenes del mismo subgrupo ($p = 0.176$ vs 0.709 , jóvenes vs envejecidas, respectivamente). Al igual que en el experimento 1 no se registraron muertes en los subgrupos no-isquemia e isquemia-incompleta de ratas jóvenes y envejecidas.

De esta manera se interpreta que 15 minutos de ICGT por O4V no modifica el desenlace relacionado a la asignación por subgrupos en ratas jóvenes y envejecidas, sin embargo sí produce un aumento en la mortalidad en las ratas envejecidas isquemia-completa.

Subgrupo	Desenlace posterior a la oclusión carotídea bilateral	Grupo joven N=30	Grupo envejecido N=39
Co-Is	Perdió el reflejo postural entre los 0 y 60 segundos posterior a la reperfusión	17/30 (0.567) Sobrevivieron hasta el día de la evaluación 14/17 (0.824) # Murieron durante la isquemia 2/17 (0.118) # Murieron durante la reperfusión 1/17 (0.059)	24/39 (0.615) Sobrevivieron hasta el día de la evaluación 7/24 (0.291) # Murieron durante la isquemia 13/24 (0.542) # Murieron durante la reperfusión 4/24 (0.167)
In-Is	Perdió el reflejo postural entre los 0 y 60 segundos posterior a la reperfusión pero lo recuperan durante el tiempo de isquemia	4/30 (0.130)	2/39 (0.051)
No-Is	No perdieron el reflejo postural	9/30 (0.300)	13/39 (0.333)

Tabla 7. Desenlace posterior a la O4V en el experimento 3. El desenlace posterior a la oclusión completa de las arterias carótidas comunes en el segundo día del modelo de O4V en ratas jóvenes y envejecidas se valoró en base a la asignación por subgrupos y la mortalidad por subgrupo. Co-Is, isquemia-completa; In-Is, isquemia-incompleta; No-Is, no-isquemia. Los valores se presentan como proporciones. # Ratas excluidas del análisis morfológico. Co-Is, isquemia-completa; In-Is, isquemia-incompleta; No-Is, no-isquemia. Los valores se presentan como proporciones. # Ratas excluidas del análisis morfológico.

Análisis de mediciones tradicionales y análisis de estrategia de búsqueda en los protocolos de aprendizaje y memoria.

Con el propósito de caracterizar el deterioro funcional producido por el daño en las neuronas piramidales de CA1 en las ratas envejecidas se realizaron pruebas funcionales de aprendizaje y memoria a ratas jóvenes y envejecidas de los subgrupos isquemia-completa y no-isquemia siete días posteriores a la reperusión. Las pruebas funcionales siguieron la metodología expuesta en el experimento 2 analizándose mediciones tradicionales y estrategia de búsqueda.

Análisis de variables tradicionales en el protocolo de aprendizaje.

Las variables latencia y distancia a plataforma evidenciaron un proceso de aprendizaje en todos los subgrupos teniendo siempre el mejor desempeño en las ratas jóvenes no-isquemia y el peor desempeño en las ratas envejecidas isquemia-completa. Se evidenciaron también diferencias entre los subgrupos, las cuales se conservaron en todo el protocolo de aprendizaje.

La latencia a plataforma evidenció una disminución progresiva a medida que avanzaban los días de entrenamiento, siendo las ratas jóvenes no-isquemia quienes mostraron latencias más bajas y las ratas envejecidas isquemia-completa las más altas en todos los días del protocolo (Figura 18). Las ratas jóvenes isquemia-completa tuvieron latencias más largas en comparación con las no-isquemia aunque no llegaron a el nivel de los subgrupos envejecidos no-isquemia e isquemia-completa. Las ratas envejecidas isquemia-completa tuvieron siempre las latencias más largas entre los cuatro subgrupos.

Al igual que la latencia, la distancia a plataforma evidenció una disminución progresiva durante los días del protocolo de aprendizaje en los cuatro subgrupos analizados (Figura 18). El subgrupo envejecido isquemia-completa registró las distancias más largas y con mayor oscilación en el protocolo de

aprendizaje. Se destaca además que en los primeros dos días de entrenamiento las ratas jóvenes isquemia-completa registraron distancias más largas que las ratas no-isquemia de jóvenes y envejecidas, aunque esta diferencia se pierde desde el tercer día de entrenamiento, siendo a partir de ese momento muy similar al de las ratas envejecidas no-isquemia.

Con estos resultados se identifica que el desempeño funcional en las pruebas de aprendizaje se ve modificado por la inducción de ICG en ratas jóvenes y envejecidas, siendo las ratas envejecidas con isquemia-completa las que tiene el peor desempeño entre los subgrupos.

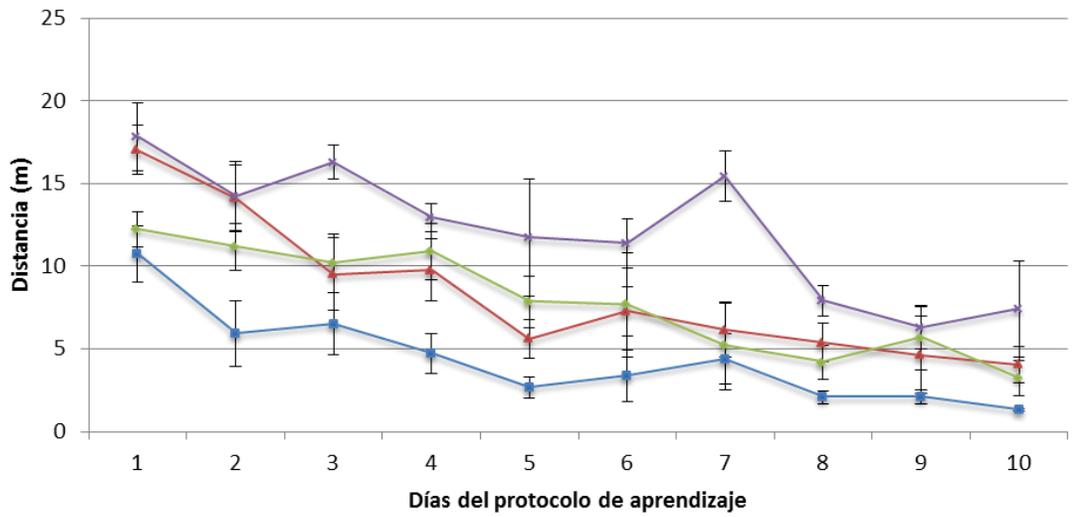
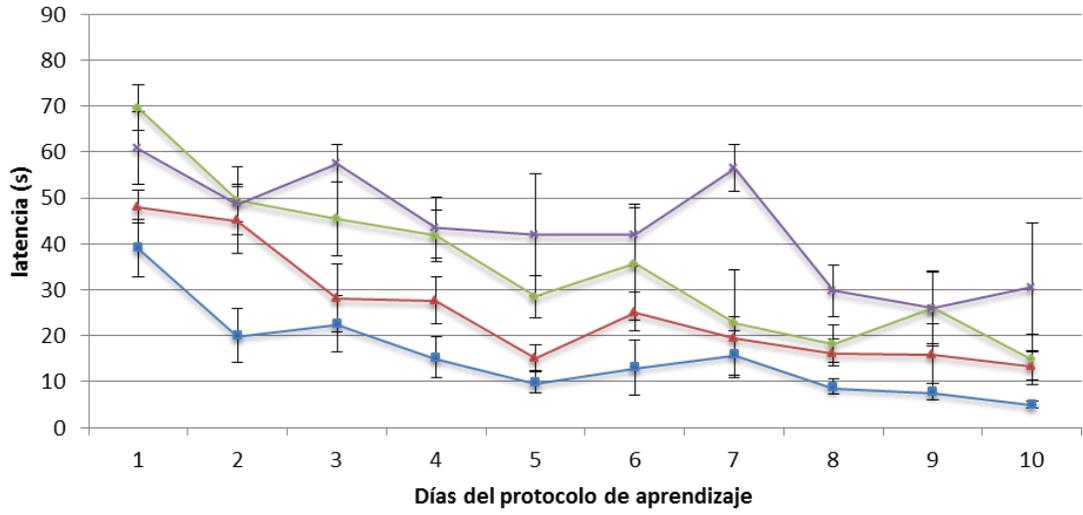


Figura 18. Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de aprendizaje del experimento 3. Se evaluó la latencia y distancia a plataforma en ratas jóvenes y envejecidas de los subgrupos (Co-Is) isquemia completa y (No-Is) no-isquemia durante los 10 días del protocolo de aprendizaje. Se reporta la media \pm error típico de la media. Se observa una disminución progresiva de latencia y distancia en los cuatro subgrupos siendo las ratas envejecidas isquemia-completa las que presentan las latencias y distancias más largas. Las ratas jóvenes no-isquemia presentaron las latencias y distancias más cortas. La comparación entre subgrupos por grupos de edad se realizó utilizando ANOVA, las diferencias significativas ($p > 0.05$) entre subgrupos Co-Is y No-Is se señalan con (*)

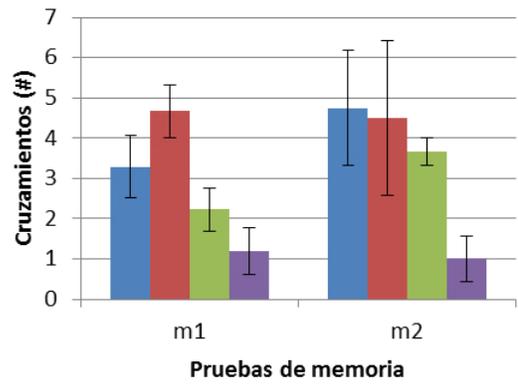
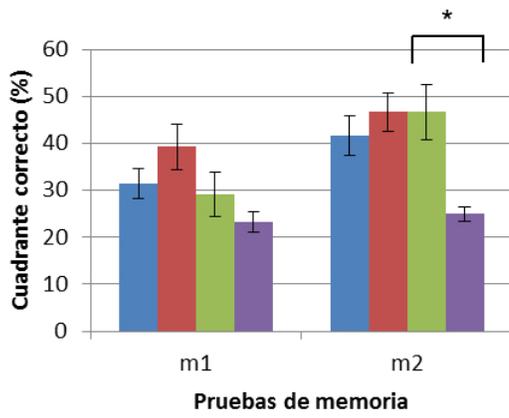
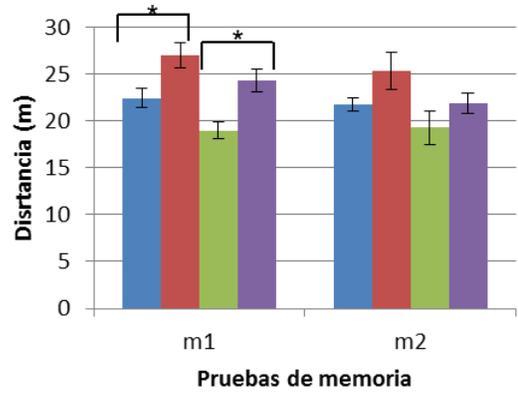
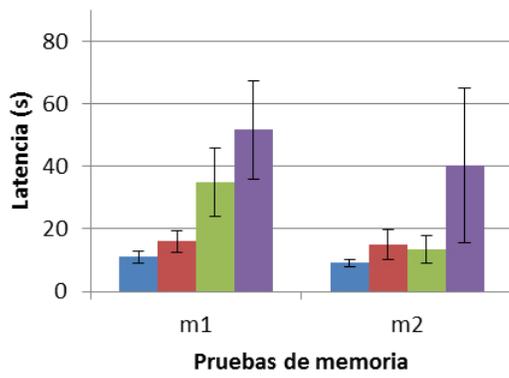
Análisis de las variables tradicionales en los protocolos de memoria.

A excepción del subgrupo envejecido isquemia-completa, todos los subgrupos mostraron evidencia de adquisición de memoria. Los subgrupos jóvenes no-isquemia e isquemia-completa lograron evidenciar adquisición de memoria desde la primera prueba, mientras que el subgrupo envejecido no-isquemia logró evidenciar la adquisición de memoria hasta la segunda prueba.

En la primera prueba de memoria realizada posteriormente al quinto día del protocolo de aprendizaje, el subgrupo envejecido isquemia-completa registró la latencia más larga hasta la primera llegada a la zona de la plataforma, el menor tiempo en el cuadrante correcto y el menor número de cruzamientos sobre la zona de la plataforma. Lo anterior indica que tuvieron el peor desempeño entre los subgrupos, aunque las diferencias con el grupo envejecido no-isquemia resultaron menores y no significativas debido al pobre desempeño de este subgrupo durante la primera prueba de memoria. Por otra parte el subgrupo joven no-isquemia registró la menor latencia, aunque paradójicamente el mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante correcto y mayor número de cruzamientos los registró el subgrupo joven isquemia-completa. Lo anterior es explicado por una menor insistencia del subgrupo joven no-isquemia sobre la zona de la plataforma. En esta primera prueba de memoria la distancia mostró ligeras diferencias entre los subgrupos.

En la segunda prueba de memoria realizada posteriormente al décimo día de entrenamiento en el protocolo de aprendizaje. Se evidenció que a excepción del subgrupo envejecido isquemia-completa, todos los subgrupos registraron una mejoría en el desempeño de la prueba al disminuir su latencia, aumentar el tiempo en el cuadrante correcto y aumentar el número de cruzamientos en la zona de la plataforma.

De esta manera se identifica que el subgrupo envejecido no-isquemia requiere de diez días de entrenamiento para mejorar su desempeño al grado de hacer más notoria la diferencia respecto al subgrupo envejecido isquemia-completa quien a pesar de tener el mismo entrenamiento que su contraparte no-isquemia no mejoraron su desempeño en la prueba de memoria y por lo tanto presentan una mayor alteración en comparación con las ratas jóvenes isquemia-completa.



Jov No-Is

Env No-Is

Jov Co-Is

Env Co-Is

Figura 19. Mediciones tradicionales evaluadas en el protocolo de memoria del experimento 3. Se evaluó la latencia, distancia, tiempo en el cuadrante correcto y cruzamientos a la zona de la plataforma. Se reporta la media \pm error típico de la media de los subgrupos no-isquemia e isquemia-completa de ratas jóvenes y envejecidas. Las comparaciones entre grupos y entre pruebas se realizaron utilizando la prueba T de Student para muestras independientes y relacionadas respectivamente. Los valores de $p \leq 0.05$ se indican con (*).

Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje.

Durante el protocolo de aprendizaje, a excepción del subgrupo envejecido isquemia-completa, todos los subgrupos analizados presentaron una mejoría en la estrategia de búsqueda, aunque se identificaron diferencias entre cada uno de ellos.

El subgrupo joven no-isquemia mejoró la estrategia de búsqueda al incrementar el número de estrategias directas seguido de incrementar la precisión de las mismas. En contraste, el subgrupo joven isquemia-completa también siguió un patrón de mejoría, aunque el porcentaje de estrategias indirectas o directas de menor precisión fue mayor en comparación con el grupo joven no-isquemia. Estos resultados indican que la estrategia de búsqueda utilizada por las ratas jóvenes se modifica por la inducción de ICG durante 15 minutos.

Las estrategias de búsqueda utilizadas por el subgrupo envejecido no-isquemia son diferentes a las utilizadas por el subgrupo joven no-isquemia. En el subgrupo envejecido no-isquemia fueron más frecuentes las estrategias de búsquedas indirectas y directas de poca precisión, además de observarse mayor número de estrategias inefectivas durante los primeros cinco días de entrenamiento. Los resultados observados en los subgrupos joven y envejecido no-isquemia son similares a los observados en las ratas jóvenes y envejecidas

del experimento 2, lo cual indica que las ratas asignadas al subgrupo no-isquemia pueden ser utilizadas como grupo sham-control debido a que la intervención no produce daño en el área CA1 y no modifica su desempeño funcional en el protocolo de aprendizaje.

El subgrupo envejecido isquemia-completa registró estrategias inefectivas incluso en los últimos 5 días del protocolo de aprendizaje, además de incrementar el número de estrategias indirectas y disminuir el número de estrategias directas de alta precisión. De este modo se identificó que las ratas envejecidas isquemia-completa tienen una mayor repercusión funcional en los protocolos de aprendizaje evidenciado a través del análisis de estrategia de búsqueda utilizando el AEB.

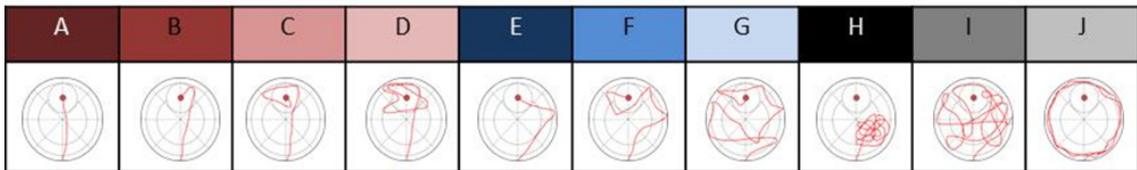
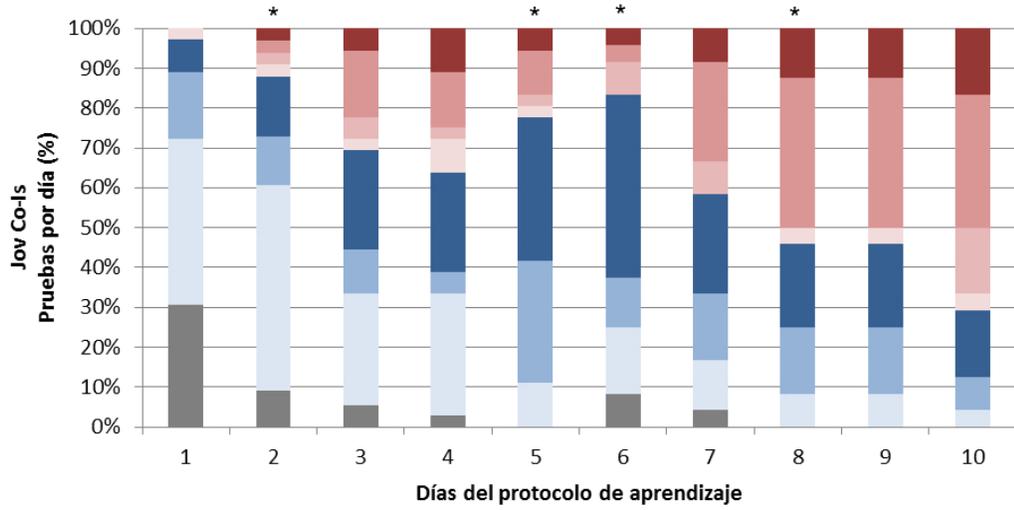
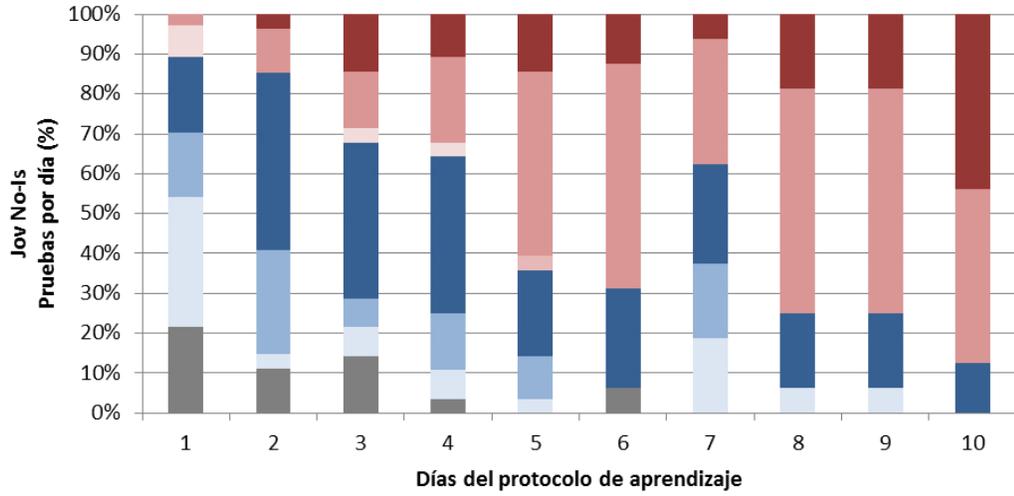


Figura 20. Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje del experimento 3 en ratas jóvenes. La estrategia de búsqueda se analizó utilizando el AEB. Se reportan los resultados utilizando distribución de frecuencias por día de entrenamiento. Se realizó la comparación entre grupos utilizando la prueba de Chi Cuadrada. Los valores con $p \leq 0.05$ se muestran con (*). Se observa una mejoría progresiva desde los primeros cinco días en la estrategia de búsqueda en las ratas no-isquemia (No-Is), mientras el subgrupo isquemia-completa (Co-Is) mostró dicha mejoría a partir del 6º día de entrenamiento.

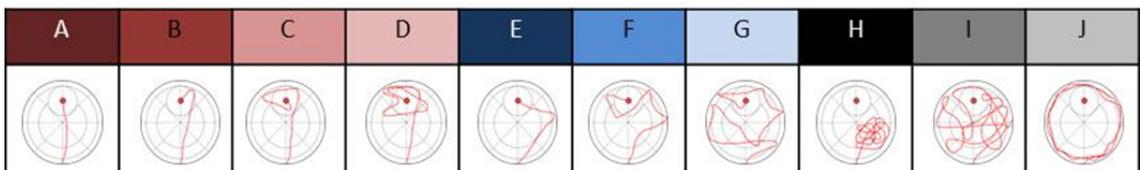
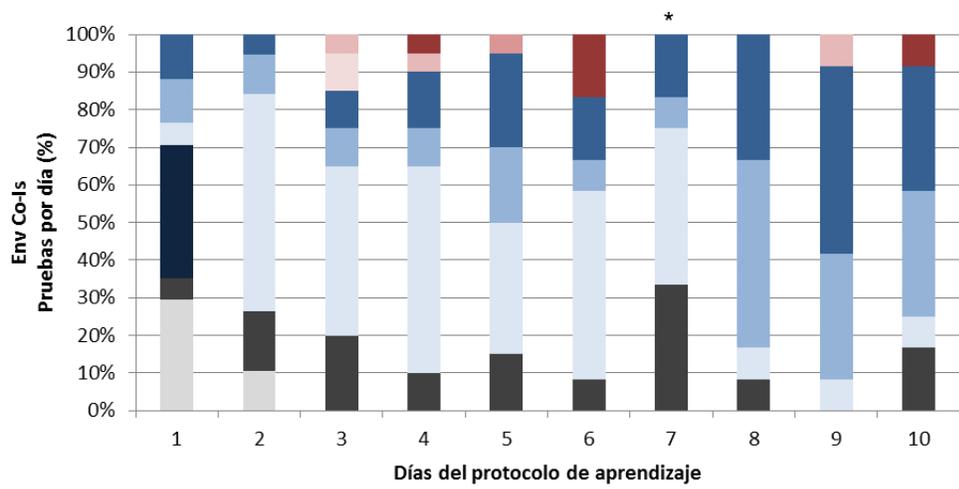
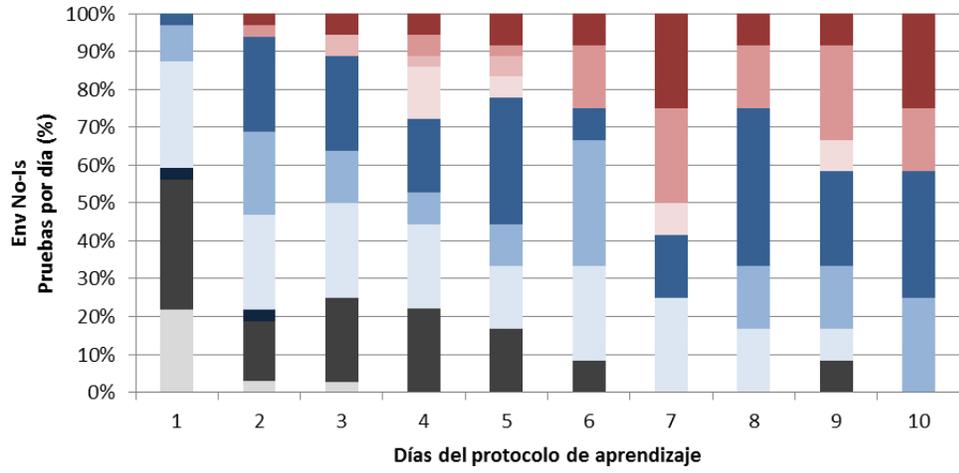


Figura 21. Análisis de la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje del experimento 3 en ratas envejecidas. La estrategia de búsqueda se analizó utilizando el AEB. Se reportan los resultados utilizando distribución de frecuencias por día de entrenamiento. Se realizó la comparación entre grupos utilizando la prueba de Chi Cuadrada. Los valores con $p \leq 0.05$ se muestran con (*). Se observa una mejoría progresiva desde los primeros cinco días en la estrategia de búsqueda en las ratas no-isquemia (No-Is), mientras que el subgrupo isquemia-completa (Co-Is) no mostró dicha mejoría.

Análisis de la estrategia de búsqueda en los protocolos de memoria.

En los protocolos de memoria el análisis de la estrategia de búsqueda indicó que los subgrupos no-isquemia jóvenes y envejecidos aumentan el número de estrategias directas entre la primera y la segunda prueba de memoria; mientras que los subgrupos isquemia-completa no incrementan el número de estrategias de búsqueda directas entre cada prueba de memoria.

En la primera prueba de memoria la estrategia de búsqueda del subgrupo joven no-isquemia mostró el mayor número de estrategias directas y de alta precisión, que en comparación con el subgrupo joven no-isquemia resultó de mejor calidad. El subgrupo envejecido no-isquemia utilizó estrategias directas en la mayoría, mientras que los isquemia-completa utilizaron estrategias indirectas e inefectivas. En la segunda prueba de memoria los subgrupos no-isquemia incrementaron el porcentaje de estrategias directas, aunque el aumento de precisión se observó únicamente en el envejecido. Por otra parte, los subgrupos joven y envejecido isquemia-completa aumentaron la precisión de las estrategias indirectas y aunque en el envejecido siguieron apareciendo estrategias inefectivas.

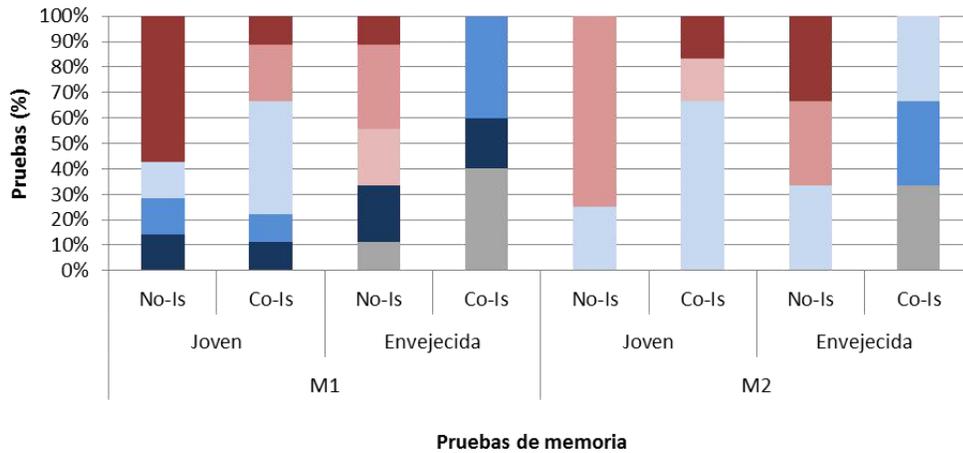


Figura 22. Análisis de estrategia de búsqueda en los protocolos de memoria del experimento 3. La estrategia de búsqueda se analizó utilizando el AEB. Se realizó la comparación entre grupos utilizando la prueba de Chi Cuadrada. Los valores con $p \leq 0.05$ se muestran con (*). En la primera prueba de memoria (M1) las ratas jóvenes no-isquemia (No-Is) mostraron las mejores estrategias de búsqueda, mientras que las ratas envejecidas isquemia-completa (Co-Is) mostraron las peores estrategias de búsqueda, llegando incluso a ser inefectivas. En la segunda prueba de memoria (M2) se observaron estrategias de búsqueda similares a las observadas en la primera prueba de memoria.

Análisis morfológico del hipocampo CA1 después de realizar a las pruebas funcionales.

Los cerebros de las ratas del experimento 3 fueron analizados a nivel del área CA1 del hipocampo a los 21 DPR utilizando las escalas de daño morfológico (Figura 23) y patrón morfológico (Figura 24) tal y como se describió en el experimento 1.

La escala de daño morfológico evidenció que en el subgrupo joven isquemia-completa el daño morfológico del área CA1 del hipocampo en la mayoría de los sujetos (9/14) fue grado 3, sin embargo en algunas ratas se observaron grados menores de daño a pesar de haber permanecido con pérdida del reflejo postural durante los 15 minutos de isquemia (5/14). Por otra parte la totalidad de las ratas del subgrupo joven no-isquemia tuvieron daño morfológico grado de 0 (9/9). Las ratas jóvenes clasificadas como isquemia-incompleta tuvieron daño menor entre 2 y 1.5 (3/3). En las ratas envejecidas, la escala de daño morfológico evidenció que la mayoría de las ratas del subgrupo isquemia-completa tuvieron daño morfológico que involucró la totalidad de las neuronas (daño morfológico grado 3) (5/7); mientras que el resto presentó daño incompleto. Las ratas del subgrupo no-isquemia tuvieron en su totalidad (13/13) una escala de daño morfológico grado 0. Las ratas envejecidas clasificadas como isquemia-incompleta tuvieron daño morfológico menor a 1.5.

La escala de patrón morfológico evidenció que en los subgrupos joven y envejecido isquemia-completa existió grado 3 de patrón morfológico en la mayoría de las ratas, aunque algunos sujetos presentaron daño menor. Las ratas jóvenes y envejecidas no-isquemia presentaron patrón morfológico grado 0, sin evidencia de daño neuronal. Las ratas del subgrupo isquemia-incompleta mostraron un patrón de daño de 1.5 o 1, con presencia de daño unilateral de la totalidad de las neuronas o daño parcial bilateral de algunas o la mayoría de las neuronas.

Con estos resultados se comprueba que el desempeño funcional alterado observado en las ratas de los subgrupos jóvenes y envejecidos con isquemia-completa se debe a una afectación de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Por otra parte no se observó daño en el hipocampo de ratas envejecidas no-isquemia, lo cual indica que la diferencia en su desempeño funcional respecto a las ratas jóvenes no-isquemia es debido a alteraciones funcionales intrínsecas de las ratas y probablemente causadas por el proceso de envejecimiento.

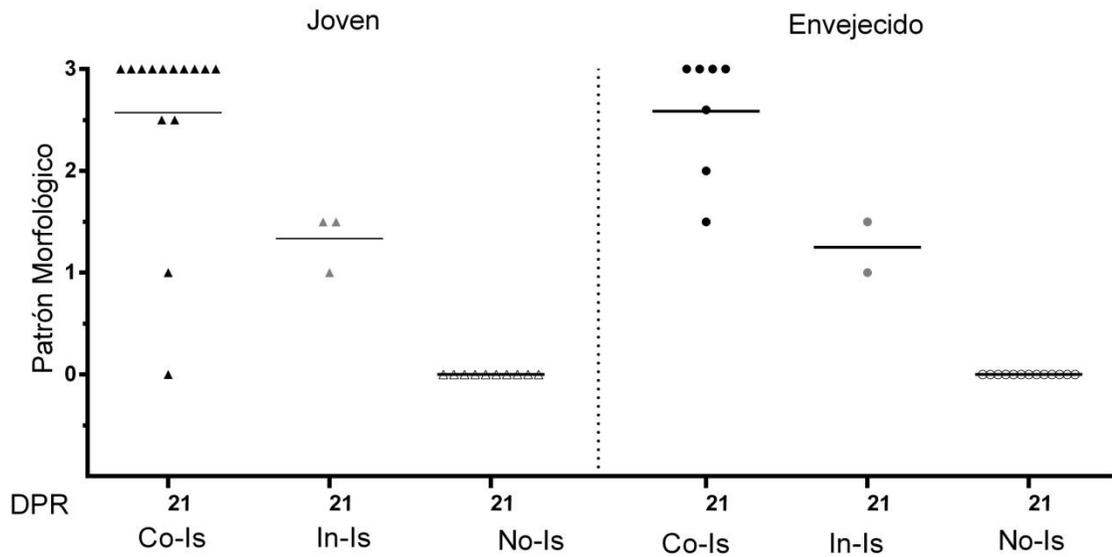


Figura 24. Análisis morfológico en base al patrón de patrón morfológico del área CA1 del hipocampo en ratas jóvenes y envejecidas del experimento 1. Se observa la distribución de las ratas jóvenes y envejecidas asignadas a los subgrupos isquemia completa (Co-Is), isquemia-incompleta (In-Is) y no-isquemia (No-Is). Cada figura representa una rata. La línea horizontal representa la media de cada subgrupo calculada en base al daño morfológico de cada rata.

DISCUSIÓN

**Modelo de O4V como una solución para la actual discrepancia
relacionada al factor edad.**

La adaptación de los actuales modelos de isquemia cerebral para su uso en animales envejecidos representa un importante reto para la investigación actual. La mayor contribución de este proyecto es la adaptación del modelo de O4V y sus técnicas de evaluación para su uso en ratas envejecidas como un modelo de ICG y envejecimiento. Esta contribución responde a la necesidad de adaptaciones en los modelos de IC para mejorar la transferencia de resultados experimentales hacia la investigación clínica y la práctica (1, 2, 61).

El envejecimiento modifica el desenlace respecto a la mortalidad posterior a la O4V en ratas envejecidas.

El desenlace de un modelo de IC es uno de los aspectos más relevantes durante su replicación ya que permite una adecuada comparación de resultados entre diferentes estudios y laboratorios. A pesar de lo anterior, pocos estudios que utilizaron un modelo de ICG en ratas jóvenes y envejecidas reportan este aspecto en sus resultados (Tabla 8). La escasa evidencia disponible sugiere una mayor mortalidad en las ratas envejecidas (44, 49).

Durante los experimentos 1 y 3 de nuestro estudio no existieron diferencias significativas en la asignación de los sujetos en base a su desenlace clínico (conservación, pérdida parcial o pérdida completa del reflejo postural). Lo cual indica que las modificaciones anatómicas de las ratas envejecidas como el aumento del tamaño corporal, aumento del tejido adiposo, mayor profundidad del plano quirúrgico y estrechamiento del foramen alar no representan limitantes para el uso del modelo de O4V en ratas envejecidas.

A diferencia del desenlace respecto a la asignación por subgrupos, el desenlace respecto a la mortalidad evidenció un aumento significativo de la mortalidad en las ratas envejecidas del subgrupo isquemia-completa. Esto representa un reto

metodológico, ya que se requiere de un número mayor de ratas envejecidas para alcanzar una N similar a la de las jóvenes isquemia-completa.

El aumento en la mortalidad en el subgrupo envejecido con isquemia-completa puede ser explicado por los cambios intrínsecos de las ratas envejecidas causados por la edad avanzada. Existen reportes que documentan que la respuesta adaptativa a la disminución brusca del flujo cerebral hacia el tallo encefálico se encuentra alterada en ratas envejecidas (20). Estos cambios probablemente aumentaron la susceptibilidad de los animales viejos a la IC, produciendo una hipoperfusión más severa encefálica y afectando el centro respiratorio. Para confirmar este fenómeno, son necesarias evaluaciones del flujo cerebral durante la inducción de la isquemia. Al respecto de la mortalidad en los modelos de IC, esta se propone como un indicador negativo de desenlace en la ejecución de investigación con el modelo de O4V en ratas envejecidas.

Daño neuronal en el Hipocampo CA1 en ratas envejecidas con isquemia-completa.

Pocos estudios han evaluado el daño neuronal del hipocampo CA1 envejecido utilizando un modelo de ICG (30, 44, 46-49) (Tabla 8). En los experimentos 1 y 3 se utilizaron dos métodos de evaluación aceptados y validados para la de

evaluación del daño morfológico en el hipocampo CA1. Nuestros resultados indicaron que en ratas Wistar macho envejecidas 15 minutos de ICGT por O4V producen daño completo y homogéneo desde el 4 DPR y este daño persiste hasta el 14 DPR. En contraste, algunas ratas jóvenes al 4 y 14 DPR mostraron daño parcial en el hipocampo CA1, representado por un patrón morfológico con afectación heterogénea de las neuronas (patrón morfológico grado 1 o 2). Las anteriores observaciones indican la posibilidad de que el hipocampo CA1 de las ratas envejecidas tiene una susceptibilidad a la ICGT mayor o igual que en las ratas jóvenes.

Una observación importante en el experimento 1 se refiere a que nuestros datos indicaron que en las ratas Wistar macho envejecidas las neuronas del hipocampo CA1 no sufren daño en un patrón más retardado en comparación con las ratas jóvenes. Este resultado contradice los reportes que sugieren un efecto neuroprotector del envejecimiento sobre estas neuronas (30, 46). Es posible que una explicación a esta situación sea que el tiempo de isquemia utilizado por estos estudios (30, 46) fue menor en comparación con el utilizado en los experimentos 1 y 3 o a la presencia de isquemia incompleta en las ratas evaluadas por estos estudios. Para comprobar la anterior aseveración es conveniente realizar más experimentos en los cuales se evalúe el daño en días previos al 4DPR y en caso de no encontrar diferencias se podría evaluar el efecto de un tiempo de isquemia más corto (*e.g.* 10 minutos de ICGT).

Por otra parte, otros estudios que han utilizado modelos de ICGT en ratas envejecidas reportan un mayor daño en las ratas envejecidas postulado al envejecimiento como un factor deletéreo durante la evolución de la IC (44, 47-49). Nuestros resultados coinciden parcialmente con estos reportes ya que las diferencias más evidentes fueron al 4 DPR, aunque no lograron significancia estadística. Una explicación para esta ausencia de diferencia significativa es que el daño y patrón morfológico observado al 4 DPR en las ratas jóvenes isquemia-completa resultó ser mayor que el esperado según la literatura. Una explicación probable para este hecho es que nuestras ratas jóvenes tenían una edad y peso ligeramente mayor al utilizado por los reportes originales del modelo. Es probable que un ligero aumento en la edad de nuestras ratas jóvenes sea la explicación para nuestros hallazgos. Esta aseveración podría ser confirmada al realizar más estudios que evalúen el daño previo al 4 DPR o utilicen un tiempo de isquemia menor a 15 minutos.

Algunas consideraciones limitan la comparación entre estudios (Tabla 8). Primero, no todos los estudios utilizaron la misma cepa de ratas; y algunas diferencias se han reportado a razón de esta diferencia (62). Segundo, el método de inducción de ICGT no fue idéntico entre estudios. Esta diferencia es una limitante para la comparación de resultados porque el mecanismo de daño cerebral no es exactamente el mismo entre modelos a pesar de que todos

producen ICGT. Tercero, la edad de las ratas y la duración de la isquemia no fue exactamente la misma entre estudios. Aunque estas consideraciones dificultan la comparación de resultados, estas establecen la dirección de futuras investigaciones que permitan entender con mayor claridad el efecto del envejecimiento sobre las neuronas CA1 del hipocampo.

Modelo	Cepa	Grupos de edad (meses)	Duración de isquemia (minutos)	Cuantificación del daño	Tiempo de evaluación (DAR)	Mortalidad	Daño por isquemia cerebral	Referencia
O2V + Hipoxia	F 344	J: 3-4 E: 24-26	10	IRM		1 y 2	Mayor mortalidad en ratas envejecidas Distribución del daño idéntico entre ratas jóvenes y envejecidas. Lesiones más severas en ratas envejecidas	Canese [11]
O2V + Hipoxia	F 344	J: 3-6 E: 20-24	10	IRM	TTC	1 (1 h – 3 h)	No reportada Daño más severo en ratas envejecidas Lesiones más severas en el hipocampo de ratas envejecidas	Canese [13]
O2V + Hipotensión	Wistar	J: 2-3 E: 26-28	12	Conteo de neuronas dañadas: - Daño isquémico - Porcentaje de neuronas necróticas		7	No reportada Daño más severo en la corteza y estriado de ratas envejecidas. Daño más severo en el hipocampo CA1 de ratas jóvenes.	Sutherland [16]
Arresto cardíaco	F344	J: 6 E: 12 y 24	5	Conteo de neuronas normales (Neuronas vivas)		4	Mayor mortalidad en ratas envejecidas Daño más severo en el hipocampo CA1 de ratas envejecidas.	Xu [15]
O2V	SHR	J: 5-6 E: 18-22	20	Escala semicuantitativa: - Patrón de daño		7	No reportada Daño isquémico más severo en el estriado e hipocampo CA1 de ratas envejecidas hipertensas.	Yao [14]
O4V	F344	J: 4 E: 24	10	Conteo de neuronas normales: Proporción de células sobrevivientes		3, 8 y 14	No reportada Daño más severo en el hipocampo CA1 de ratas jóvenes a los 4 y 7 DPR pero sin diferencia entre jóvenes y envejecidas a los 14 DPR. El envejecimiento retarda la muerte neuronal en el hipocampo CA1.	He [17]
O4V	Wistar	J: 3-6 E: 18-21	15	Escalas semicuantitativas: Daño morfológico Patrón de daño		4, 7 y 14	Mayor mortalidad en ratas envejecidas No se observe diferencia en la escala de daño morfológico. Mayor daño en la rata envejecida en la escala de patrón morfológico sin mostrar diferencias significativas.	Presente estudio

Tabla 8. Comparación de los diferentes estudios que han analizado el efecto del envejecimiento sobre el fenómeno de ICG. Se Identifican las principales aportaciones del presente proyecto referentes al efecto del envejecimiento sobre el efecto morfológico y funcional del modelo de O4V. (O2V) modelo de oclusión de dos vasos, (O4V) modelo de oclusión de cuatro vasos, (F344) ratas Fischer 344, (SHR), Ratas espontáneamente hipertensas, (J) grupo joven, (E) grupo envejecido, (IRM) imagen por resonancia magnética, (TTC) tinción de cloruro de trifeniltetrazolium (DPR) días posterior a la reperusión.

Mecanismos de daño neuronal del área CA1 del hipocampo en ratas envejecidas secundario a ICGT en ratas envejecidas.

El daño por isquemia/reperfusión en los modelos de ICGT afecta las regiones más susceptibles del encéfalo, entre ellas a las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Las descripciones originales en ratas jóvenes establecen que el daño del área CA1 avanza de medial a lateral iniciando a los 2 DPR y concluyendo a los 7 DPR (60). Este fenómeno de progresión del daño se esperaba encontrar en nuestro experimento tanto en ratas jóvenes como envejecidas. Sin embargo basados en los resultados del experimento 1, esta progresión no se pudo evidenciar.

Otros estudios no han descrito esta progresión, y en lugar de ello, establecen que el daño en el hipocampo afecta de un modo heterogéneo a las neuronas piramidales, es decir, que el daño afecta a todas las porciones del área CA1 afectando a algunas o la mayoría de las neuronas (46, 48). En los resultados del experimento 1, el patrón morfológico heterogéneo fue observado solo en algunas ratas del subgrupo joven isquemia-completa a los 4 y 14 DPR. Es importante determinar en estudios posteriores si la disminución del tiempo de isquemia pudiera resultar en una progresión perceptible del daño o patrón morfológico a lo largo de los días de evaluación.

El mecanismo presente en el daño retardado en las neuronas CA1 del hipocampo durante los modelos de ICGT es denominado muerte celular retardada (MCR). Este fenómeno de muerte neuronal se ha evidenciado en la zona de penumbra de un EVC isquémico (63, 64) y representa un punto de convergencia entre esta entidad clínica y los modelos de ICGT. El mecanismo subyacente a la MCR no está completamente determinado. Algunos reportes mencionan que este ocurre debido a un fenómeno de apoptosis, necrosis o una combinación de ambas (46). El fenómeno apoptótico en la MCR parece involucrar la activación de la vía intrínseca a través de las caspasas 3 y 9 (46). Otro posible mecanismo relacionado a MCR incluyen el estrés oxidativo, inflamación y respuesta glial (49).

Múltiples mecanismos celulares relacionados con el daño neuronal isquémico son modificados por el proceso de envejecimiento (11). Estas modificaciones en las ratas envejecidas representan las posibles explicaciones para las diferencias en la evolución y efecto final de la isquemia cerebral y que a su vez pudiera causar una variación en los resultados de intervenciones diagnósticas y terapéuticas. Respecto a estas hipótesis, se necesitan más experimentos para explorar las respuestas moleculares del cerebro envejecido a la isquemia cerebral.

El envejecimiento afecta el desempeño funcional de las ratas en los protocolos de aprendizaje y memoria del LAM.

El envejecimiento afecta la morfología y función de cerebro (15), de tal modo la interpretación de las evaluaciones funcionales debe ajustarse a las variaciones debidas al proceso normal de envejecimiento. El LAM fue diseñado para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas jóvenes. A la fecha existen estudios que han documentado un diferente desempeño en animales envejecidos (55). En el experimento 2 del presente proyecto se corroboró que el envejecimiento modifica el desempeño funcional de las ratas en los protocolos de aprendizaje y memoria; lo cual fue evidenciado por medio de las mediciones tradicionales y el análisis de la estrategia de búsqueda.

Las ratas envejecidas conservan su habilidad de aprender utilizando preferentemente estrategias indirectas.

El protocolo de aprendizaje utilizado en el experimento dos mostró que las ratas envejecidas preservan la habilidad de aprender, sin embargo registran latencias y distancias más largas que las de las ratas jóvenes y utilizan estrategias de búsqueda indirectas preferentemente.

La disminución progresiva de latencia y distancia en las ratas envejecidas durante el protocolo de aprendizaje encontrada en nuestro experimento ya ha sido reportada previamente por otros estudios (54, 55) . Los datos obtenidos en el experimento dos mostraron diferencias significativas en algunos días de entrenamiento aunque no en la totalidad. Esta ausencia parcial de diferencias significativas pudo ser debida a las siguientes razones. Primera: las ratas envejecidas registraron latencias y distancias con una alta variabilidad inter-sujeto; lo cual puede ser justificado por que el envejecimiento no afecta homogéneamente a todos los sujetos. Este fenómeno podría ser extrapolado al proceso de envejecimiento exitoso que desarrollan algunos adultos mayores, los cuales tienen habilidades intelectuales intactas a pasar de la avanzada edad. Probablemente una caracterización más detallada del deterioro funcional en memoria relacionado a la edad y un control mayor de los factores a los que están expuestas las ratas en el proceso de envejecimiento permitirá distinguir los factores que modifican esta diferente afectación de las ratas envejecidas en los protocolos del LAM. Segundo: las ratas jóvenes utilizadas en el experimento tuvieron una edad 5 ± 1 mes, es decir que tienen un grado menor de envejecimiento y existen reportes que evidenciaron que las diferencias significativas ente grupos de edad son observadas entre ratas envejecidas y ratas extremadamente jóvenes(55).

En cuanto a la estrategia de búsqueda utilizada por animales envejecidos durante el protocolo de aprendizaje se identificó que estas utilizan con mayor

frecuencia estrategias indirectas durante los protocolos de aprendizaje. Este hallazgo también ha sido reportado por otros estudios donde incluso asocian la adopción de estrategias indirectas con la disminución de la neurogénesis en el hipocampo (55). Desconocemos si una prolongación del protocolo de aprendizaje por más de 10 días pudiera producir un aumento en el número de estrategias directas hasta llegar al grado de lo observado en ratas jóvenes.

Las ratas envejecidas requieren de 10 días de entrenamiento para asegurar una prueba de memoria satisfactoria.

Las mediciones tradicionales usualmente utilizadas en las pruebas de memoria son el tiempo en el cuadrante correcto y el número de cruzamientos a la plataforma. De estas dos mediciones solo el número de cruzamientos a la zona de la plataforma mostró diferencias significativas durante la primera prueba de memoria ya que en la segunda prueba de memoria las ratas envejecidas alcanzaron el desempeño de las ratas jóvenes. La falta de diferencias significativas en el tiempo en cuadrante correcto es explicada por la falta de insistencia de algunas ratas jóvenes una vez que identificaban que esta no estaba en el estanque. De esta manera se identifica que las ratas envejecidas requieren de 10 días de entrenamiento para lograr el desempeño de las ratas jóvenes.

La exploración de la intención inicial de la rata para encontrar la zona de la plataforma durante las pruebas de memoria aporta datos interesantes a discutir respecto al desempeño en la prueba de memoria. Para explorar la intención inicial primero se utilizaron las variables latencia y distancia hasta el primer cruzamiento a la zona de la plataforma. Estas dos variables mostraron diferencias significativas entre jóvenes y envejecidas durante la primera prueba de memoria pero estas diferencias se perdieron en la segunda prueba de memoria. Estas dos variables mostraron un comportamiento similar a lo observado durante el último día del protocolo de entrenamiento previo a la prueba de memoria correspondiente. Una gran limitante de estas dos variables para explorar la intención inicial es que no evalúan si el cruzamiento pudo ser debido al azar, no describe la distribución del recorrido y se afectan fácilmente por limitantes físicas de las ratas. Para resolver estas limitantes se optó por realizar el análisis de la estrategia de búsqueda hasta el primer cruzamiento. En este análisis se evidenció que las ratas envejecidas utilizan principalmente estrategias de búsqueda indirectas en la primer prueba de memoria pero para la segunda prueba estas tienen un desempeño similar al observado en las ratas jóvenes.

Explicaciones de las diferentes estrategias de búsqueda utilizadas.

Durante la ejecución de una prueba de memoria como las de los protocolos del LAM, se puede localizar la plataforma por medio de dos maneras, utilizando la memoria espacial (basado en lugar) o no-espacial (relacional) (65). Las estrategias de búsqueda clasificadas como directas o indirectas en el AEB permiten una distinción importante ya que una estrategia directa podría indicar el uso de memoria espacial mientras el uso continuo de una estrategia indirecta indicaría el uso de memoria relacional. Algunos estudios han descrito una preferencia de estrategias de búsqueda indirectas en pacientes adultos mayores utilizando un LAM virtual (58). La memoria espacial se ha relacionado fuertemente como una función del hipocampo, sin embargo la memoria no-espacial se ha relacionado con otras áreas de la corteza. Este hallazgo indica que durante el proceso de envejecimiento el proceso de aprendizaje de un lugar en particular es diferente entre jóvenes y envejecidos y podría involucrar diferentes áreas del cerebro.

La estrategia de búsqueda como un indicador de aprendizaje y memoria.

Nuestro estudio evidenció que la estrategia de búsqueda es un indicador útil para evidenciar el proceso de aprendizaje y la adquisición de memoria. Lo anterior debido a que la estrategia de búsqueda en el protocolo de aprendizaje mejoró a medida que las mediciones tradicionales también lo hacían. Además en las pruebas de memoria, la adquisición de estrategias de búsqueda directas se relacionó con un aumento en el número de cruzamientos sobre la zona donde estaba la plataforma.

El uso del análisis de la estrategia de búsqueda con el AEB como indicador de aprendizaje y adquisición de memoria ofrece algunas ventajas. 1) La estrategia de búsqueda no es modificada por cambios físicos relacionados al envejecimiento como la obesidad, velocidad de nado y fuerza (55). 2) El análisis estadístico de la estrategia de búsqueda es utilizando un análisis de frecuencias, el cual se ve menos afectado por la variabilidad del desempeño en las mediciones tradicionales. 3) La estrategia de búsqueda describe mejor la intención inicial y la distribución del tiempo y la distancia recorrida, además de permitir la distinción en los aspectos de eficiencia, dirección/localización y precisión. 4) Debido a que el envejecimiento modifica la estrategia de búsqueda de los individuos (54), esta última adquiere mayor relevancia en la evaluación

funcional de los animales envejecidos y la afectación que presentan posterior a un fenómeno patológico como la IC.

Métodos para evaluar la estrategia de búsqueda.

En la actualidad existen ya algunos métodos para evaluar la estrategia de búsqueda. Estos métodos están basados en programas computacionales o algoritmos basados en el análisis cualitativo de los recorridos. El AEB propuesto en este trabajo resulta un método confiable y reproducible que aborda de una manera sencilla los principales componentes de una estrategia de búsqueda. Estos componentes son evaluados por medio de tres preguntas que derivan a la clasificación ordinal de las estrategias, además de permitir una distinción entre estrategias efectivas directas, efectivas indirectas e inefectivas.

Este nuevo algoritmo puede ser utilizado sistemáticamente para evaluar la estrategia de búsqueda y resolver el problema metodológico relacionado a la variabilidad de las mediciones tradicionales en ratas envejecidas. La metodología del AEB se describe a detalle en la figura 7. Esta descripción fue utilizada para capacitar a los evaluadores del algoritmo y permitió lograr una excelente concordancia inter-observador en el rubro de la eficacia y direccionalidad/localización y una buena concordancia inter-observador para los

rubros de precisión y clasificación final. Además este algoritmo permite una clasificación de todos los recorridos sin importar su complejidad.

El deterioro funcional producido por ICGT en las ratas envejecidas es mayor al de las ratas jóvenes.

El análisis de las mediciones tradicionales y estrategia de búsqueda en el experimento tres demostró que las ratas envejecidas tienen una mayor alteración funcional tras sufrir ICGT por 15 minutos. Este hallazgo representa el primer reporte de las alteraciones funcionales en la memoria espacial en ratas envejecidas por un modelo de ICGT con afectación del hipocampo.

Las ratas jóvenes presentan una recuperación mayor que la observada en ratas envejecidas.

En las ratas jóvenes isquemia-completa fue evidente un proceso de recuperación a medida que avanzaban los días de aprendizaje. Esta situación coincide con reportes que han establecido que los animales jóvenes tienen una recuperación más rápida y más completa que los animales envejecidos (11). Algunos reportes han identificado que en ratas jóvenes con daño en el hipocampo por ICGT se evidenció la presencia de neurogénesis a los 90 DPR

lo cual a su vez se asociaba con una mejoría en el desempeño de pruebas funcionales de aprendizaje y memoria (66).

Deterioro funcional de las ratas envejecidas con isquemia en el protocolo de aprendizaje.

El proceso de aprendizaje en ratas envejecidas isquemia-completa se encontró alterado, siendo la estrategia de búsqueda el principal indicador de esta alteración. Aunque el análisis de las variables tradicionales como latencia y distancia a plataforma mostraron que el subgrupo envejecido isquemia-completa obtuvo las latencias y distancias más largas; las alteraciones sobre estas variables resultan menos evidentes debido a las alteraciones intrínsecas que fueron evidenciadas en las ratas envejecidas durante el experimento 2 y en las ratas envejecidas no-isquemia durante el experimento 3. El análisis de estrategias de búsqueda evidenció además un cambio de las estrategias de búsqueda preferidas por las ratas envejecidas con isquemia lo cual permitió identificar dichas diferencias respecto a las ratas envejecidas no-isquemia. En cuanto a las alteraciones sobre las ratas jóvenes isquemia-completa estas resultaron evidentes tanto en las variables tradicionales como en la estrategia de búsqueda, aunque debe mencionarse que las ratas jóvenes isquemia-completa mostraron un patrón de mejoría en la estrategia de búsqueda a partir

del quinto día de entrenamiento lo cual es compatible con un proceso de recuperación más temprano en las ratas jóvenes.

Deterioro funcional en las pruebas de memoria.

Las pruebas de memoria se realizaron en dos tiempos, después del quinto y décimo día de evaluación. Con nuestros resultados se evidenció que las ratas envejecidas isquemia-completa no lograron adquirir memoria espacial en cuanto a la localización de la plataforma ya que la mayoría de las variables tradicionales de memoria no mostraron mejoría entre la primera y la segunda prueba de memoria. Al igual que en el protocolo de aprendizaje la alteración intrínseca de las ratas envejecidas dificultó la comparación entre subgrupos envejecidos y el establecimiento de diferencias significativas. En cuanto a las ratas jóvenes isquemia-completa estas evidenciaron un proceso de recuperación que produjo que algunas variables de memoria resultaran mejores en las ratas con isquemia, lo cual representa un resultado paradójico.

Explicación del cambio en la estrategia de búsqueda dependiente de la presencia o ausencia de daño en el hipocampo.

Recientes reportes sugieren que la estrategia de búsqueda es una variable que explora con mayor claridad el proceso de adquisición de memoria. Con el algoritmo utilizado es posible distinguir dos principales tipos de estrategias efectivas. Las directas son preferidas por individuos jóvenes, mientras que las indirectas son las más utilizadas por ratas envejecidas. Esta diferencia se ha asociado con el tipo de proceso de aprendizaje utilizado. Es probable que al lesionarse el hipocampo de las ratas jóvenes, el proceso de memoria haya dependido de otras áreas del encéfalo que no hayan sido afectadas.

Respecto al uso de una evaluación de memoria pre isquemia, esta no es recomendable ya que se ha evidenciado que la realización de actividad física, realización de pruebas de memoria dependientes del hipocampo y la exposición a un ambiente enriquecido son factores que estimulan la neurogénesis en la zona subgranular (ZSG) (52). A pesar de que la zona donde se identifica la neurogénesis no es la misma zona donde se produce la lesión, esto agregaría un factor más a la evaluación del hipocampo posterior a la isquemia ya que se estaría evaluando un hipocampo con probable neurogénesis.

También se ha identificado que la ICG y el envejecimiento son factores que estimulan la neurogénesis (utilizando marcador GFAP y Musashi-1), aunque por otro lado no se ha comprobado la funcionalidad de estas nuevas neuronas (67). Debe aclararse que en el estudio citado se menciona que si bien aumentó la neurogénesis el porcentaje de sobrevivencia y transformación a neurona madura fue menor en las ratas viejas.

Análisis morfológico posterior a la evaluación funcional.

El análisis morfológico realizado en los subgrupos no-isquemia e isquemia – completa de ratas jóvenes y envejecidas se realizó al 21 DPR. El análisis con hematoxilina y eosina permitió observar la presencia de daño y patrón morfológico grado 3 en la mayoría de los sujetos de los subgrupos isquemia-completa. Lo cual indica que estos grupos realizaron las pruebas funcionales con una alteración en el hipocampo. Por otra parte las ratas de los subgrupos no-isquemia tuvieron daño y patrón morfológico grado 0, lo que indica que estos sujetos realizaron las pruebas funcionales sin tener daño en el hipocampo.

Estudios sobre la respuesta morfológica crónica a la ICGT en ratas jóvenes han documentado la presencia de neurogénesis en el hipocampo posterior al insulto isquémico, y otros han documentado que estas neuronas desaparecen a los 21

DPR (68). En nuestro análisis no exploramos tal fenómeno, aunque sí se identificó un proceso de recuperación funcional mayor en las ratas jóvenes en comparación con las envejecidas. Otro fenómeno evidenciado en otros estudios es el aumento de la reactividad glial que limita el proceso de recuperación en las ratas envejecidas demostrado en modelos de ICF (35), nuestro estudio no evaluó células gliales, pero evidenció una menor recuperación funcional en ratas envejecidas. Finalmente, otros reportes han documentado una afectación crónica del área CA1 en modelos de hipoperfusión y han evidenciado también una alteración en las células de la retina, esta situación no fue valorada en nuestro estudio pero de existir, podría ser una explicación para las alteraciones en aprendizaje y memoria observadas en las ratas envejecidas isquemia-completa (69).

Consideraciones metodológicas sobre el modelo de O4V en ratas macho Wistar envejecidas.

Las ratas envejecidas son más grandes, largas y tienen mayor tejido adiposo en comparación con las jóvenes. En consecuencia, se recomienda que el entrenamiento del operador se realice de forma intercalada en los dos grupos de edad para asegurar una curva de aprendizaje paralela en los dos grupos. Todos nuestros procedimientos experimentales se realizaron intercaladamente en ratas jóvenes y envejecidas (dos ratas jóvenes y dos ratas envejecidas por

día) por el mismo operador. Durante el procedimiento, otra aparente diferencia entre grupos fue la presencia de estrechamiento del o los forámenes alares en las ratas envejecidas. Esta diferencia anatómica complicó la cauterización de las arterias vertebrales. Para resolver este problema, antes de la experimentación se adaptó la punta del electrocauterio a la forma del foramen alar estrecho. A pesar de esta adaptación, este problema técnico podría explicar la presencia de ratas no-isquemia e isquemia-incompleta, pero no explica el aumento en la mortalidad del subgrupo envejecido isquemia-completa.

El modelo de oclusión de cuatro vasos fue inicialmente descrito para producir ICGT en ratas jóvenes. En nuestra experiencia, nosotros utilizamos ratas envejecidas Wistar, una cepa común en muchos laboratorios. Nosotros proponemos que estas ratas son una opción aceptable para utilizar el 4VO modelo; sin embargo hay algunas consideraciones metodológicas que deben de atenderse durante la ejecución de este modelo.

Los animales envejecidos son más costosos que los jóvenes. Para optimizar recursos, proponemos el uso de de ratas no-isquemia como grupo sham-control, siempre y cuando los dispositivos de oclusión sean removidos en los primeros 90 segundos posterior a su colocación. Esta metodología es aceptable debido a que en nuestro estudio se comprobó que las ratas no-isquemia no

tuvieron daño neuronal en ningún día de evaluación. Esta práctica permitirá ayudar a reducir el número total de animales utilizados, especialmente animales envejecidos requeridos para la experimentación.

En las prácticas de laboratorio, las ratas con isquemia-incompleta son usualmente excluidas para su posterior evaluación. En nuestra experiencia, incluimos estas ratas para el análisis morfológico para explorar el daño neuronal. Estas ratas tuvieron daño completo en un solo hemisferio. Este fenómeno de isquemia incompleta puede ser predicho por medio de una evaluación clínica durante el tiempo de isquemia. Esta evaluación clínica incluye la evaluación bilateral de los reflejos de dolor y corneal, además de la pérdida del reflejo postural y la presencia de movimientos de escape o recuperación parcial del reflejo postural. Nosotros identificamos que las ratas con daño morfológico incompleto tuvieron una recuperación parcial del reflejo postural y reflejos coroneales y de dolor positivos unilateralmente. Entonces, el reflejo postural puede ser utilizado como un indicador clínico de isquemia incompleta.

La evaluación funcional en un modelo de IC es recomendada para entender completamente la repercusión del modelo su caracterización es recomendada antes de explorar los efectos terapéuticos de alguna intervención (2). La función del hipocampo está relacionada a la adquisición de aprendizaje y memoria

espacial, que puede ser evaluado por medio de la prueba del laberinto de agua de Morris (LAM). Por lo tanto, el uso del LAM en el modelo de ICGT en animales envejecidos necesita aún ser completamente establecido. Basados en nuestros hallazgos y experiencia, nosotros recomendamos que el 7 DPR es el mejor momento para iniciar la evaluación funcional posterior a 15 minutos de ICGT usando el modelo de O4V en ratas jóvenes y envejecidas porque en este momento el daño morfológico es completo y la incisión quirúrgica está completamente cicatrizada. Algunos estudios han confirmado que las ratas envejecidas tienen una recuperación funcional menor y más lenta en comparación con los animales jóvenes (45).

CONCLUSIÓN

Con el propósito de resolver la discrepancia clínico-experimental relacionada a los modelos de IC y el envejecimiento, se caracterizó el daño morfológico en el área CA1 y el deterioro funcional secundario a 15 minutos de ICG por O4V. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen en gran medida a la resolución de esta discrepancia y abren el panorama para futuros estudios. Estos estudios deberán estar encaminados a: 1) identificar los mecanismos involucrados en la respuesta del cerebro envejecido a la IC y 2) modificar favorablemente el fenómeno isquémico el proceso de recuperación.

En el experimento 1 se demostró que el modelo de 15 minutos de ICG por O4V puede ser utilizado en ratas Wistar macho envejecidas para estudiar el efecto del envejecimiento en el fenómeno de IC. Adicionalmente, nuestros resultados indicaron que el daño neuronal en el hipocampo CA1 de ratas envejecidas no tiene un efecto retardado y por lo tanto se descarta la posibilidad de que el envejecimiento participe como un factor neuroprotector.

En el experimento 2 se comprobó que el envejecimiento produce un cambio en el desempeño funcional de las ratas. Este diferente desempeño es identificado a través de las mediciones tradicionalmente utilizadas y el análisis de la estrategia de búsqueda. En cuanto al análisis de la estrategia de búsqueda, una contribución de especial importancia es la creación de un algoritmo para su evaluación; el cual resultó tener una buena reproducibilidad y sustento

metodológico para ser replicado en futuras investigaciones relacionadas al aprendizaje y la memoria en el LAM. Con los hallazgos y contribuciones de este experimento se aporta conocimiento valioso para el futuro desarrollo de investigación relacionada al proceso de envejecimiento y su efecto sobre los procesos cognitivos relacionados a la memoria.

En el experimento 3 se comprobó que en ratas Wistar macho envejecidas, 15 minutos de ICG por O4V producen daño en el área CA1 del hipocampo, el cual a su vez, produce deterioro funcional en los protocolos de aprendizaje y memoria espacial del LAM. Además, el análisis de variables tradicionales y estrategia de búsqueda permitió identificar que las ratas envejecidas con isquemia tiene un deterioro funcional mayor al observado en las ratas jóvenes. Estos resultados representan el primer reporte del deterioro funcional en aprendizaje y memoria espacial causado por ICG en ratas envejecidas.

De esta manera el presente trabajo sustenta las bases para posteriores investigaciones que aborden la utilización de posibles intervenciones diagnósticas, pronósticos y terapéuticas sobre IC en ratas envejecidas. Al resolver esta discrepancia, estas intervenciones podrán avanzar gradualmente en la transferencia hacia la atención de pacientes que sufren IC por cualquiera de sus causas.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía.

1. Pound P, Bracken MB. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? *BMJ*. 2014;348:g3387.
2. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*. 2009;40(6):2244-50.
3. Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P. *Stroke*. *Lancet*. 2003;362(9391):1211-24.
4. Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation*. 2001;104(18):2158-63.
5. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(1):49-51.
6. Popa-Wagner A, Buga AM, Turner RC, Rosen CL, Toescu E. Cerebrovascular disorders: role of aging. *J Aging Res*. 2012;2012:128146.
7. Popa-Wagner A, Crăițoiu S, Buga AM. Central nervous system aging and regeneration after injuries. A systematic approach. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(2):155-67.
8. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*. 2009;7:97.
9. Buga AM, Vintilescu R, Pop OT, Popa-Wagner A. Brain Aging and Regeneration after Injuries: an Organismal approach. *Aging Dis*. 2011;2(1):64-79.

10. Geocadin RG, Koenig MA, Jia X, Stevens RD, Peberdy MA. Management of brain injury after resuscitation from cardiac arrest. *Neurol Clin.* 2008;26(2):487-506, ix.
11. Popa-Wagner A, Buga AM, Kokaia Z. Perturbed cellular response to brain injury during aging. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):71-9.
12. Frenk-Mora J. Programa Nacional de Salud 2001-2006: Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial.
13. Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):123-40.
14. Buga AM, Di Napoli M, Popa-Wagner A. Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation. *Biogerontology.* 2013.
15. Mora F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues Clin Neurosci.* 2013;15(1):45-52.
16. Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(4):1706-16.
17. Firląg M, Kamaszewski M, Gaca K, Bałasińska B. Age-related changes in the central nervous system in selected domestic mammals and primates. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013;67:269-75.
18. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science.* 1997;278(5337):412-9.
19. Borràs D, Ferrer I, Pumarola M. Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol.* 1999;36(3):202-11.

20. Toyoda K, Fujii K, Takata Y, Ibayashi S, Fujikawa M, Fujishima M. Effect of aging on regulation of brain stem circulation during hypotension. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(6):680-5.
21. Foster TC. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell.* 2007;6(3):319-25.
22. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;827(1):65-75.
23. Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics.* 2011;8(3):319-29.
24. Ay H, Koroshetz WJ, Vangel M, Benner T, Melinosky C, Zhu M, et al. Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age. *Stroke.* 2005;36(12):2632-6.
25. El-Saed A, Kuller LH, Newman AB, Lopez O, Costantino J, McTigue K, et al. Geographic variations in stroke incidence and mortality among older populations in four US communities. *Stroke.* 2006;37(8):1975-9.
26. Nakayama H, Jørgensen HS, Raaschou HO, Olsen TS. The influence of age on stroke outcome. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke.* 1994;25(4):808-13.
27. Engelter ST, Bonati LH, Lyrer PA. Intravenous thrombolysis in stroke patients of ≥ 80 versus < 80 years of age--a systematic review across cohort studies. *Age Ageing.* 2006;35(6):572-80.

28. Yayan J. Effectiveness of alteplase in the very elderly after acute ischemic stroke. *Clin Interv Aging*. 2013;8:963-74.
29. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003;44(2):85-95.
30. Sutherland GR, Dix GA, Auer RN. Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke*. 1996;27(9):1663-7; discussion 8.
31. Davis M, Mendelow AD, Perry RH, Chambers IR, James OF. Experimental stroke and neuroprotection in the aging rat brain. *Stroke*. 1995;26(6):1072-8.
32. Rosen CL, Dinapoli VA, Nagamine T, Crocco T. Influence of age on stroke outcome following transient focal ischemia. *J Neurosurg*. 2005;103(4):687-94.
33. Popa-Wagner A, Schröder E, Walker LC, Kessler C. beta-Amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age. *Stroke*. 1998;29(10):2196-202.
34. Brown AW, Marlowe KJ, Bjelke B. Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. *Neurobiol Aging*. 2003;24(4):607-14.
35. Badan I, Buchhold B, Hamm A, Gratz M, Walker LC, Platt D, et al. Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(7):845-54.
36. Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, et al. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke*. 2005;36(4):847-52.

37. Zhao CS, Puurunen K, Schallert T, Sivenius J, Jolkkonen J. Effect of cholinergic medication, before and after focal photothrombotic ischemic cortical injury, on histological and functional outcome in aged and young adult rats. *Behav Brain Res.* 2005;156(1):85-94.
38. Lindner MD, Gribkoff VK, Donlan NA, Jones TA. Long-lasting functional disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts. *J Neurosci.* 2003;23(34):10913-22.
39. Markus TM, Tsai SY, Bollnow MR, Farrer RG, O'Brien TE, Kindler-Baumann DR, et al. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol.* 2005;58(6):950-3.
40. Andersen MB, Zimmer J, Sams-Dodd F. Specific behavioral effects related to age and cerebral ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999;62(4):673-82.
41. Zhang R, Kadar T, Sirimanne E, MacGibbon A, Guan J. Age-related memory decline is associated with vascular and microglial degeneration in aged rats. *Behav Brain Res.* 2012;235(2):210-7.
42. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, et al. Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience.* 1998;18(13):4914-28.
43. Zhao CS, Puurunen K, Schallert T, Sivenius J, Jolkkonen J. Behavioral and histological effects of chronic antipsychotic and antidepressant drug treatment in aged rats with focal ischemic brain injury. *Behav Brain Res.* 2005;158(2):211-20.

44. Canese R, Fortuna S, Lorenzini P, Podo F, Michalek H. Transient global brain ischemia in young and aged rats: differences in severity and progression, but not localisation, of lesions evaluated by magnetic resonance imaging. *MAGMA*. 1998;7(1):28-34.
45. Waller SB, Nyberg P, Dietz NJ. Temporal profile of neurochemical recovery following injury by transient cerebral ischemia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995;50(5):B307-14.
46. He Z, Meschia JF, Brott TG, Dickson DW, McKinney M. Aging is neuroprotective during global ischemia but leads to increased caspase-3 and apoptotic activity in hippocampal neurons. *Curr Neurovasc Res*. 2006;3(3):181-6.
47. Canese R, Lorenzini P, Fortuna S, Volpe MT, Giannini M, Podo F, et al. Age-dependent MRI-detected lesions at early stages of transient global ischemia in rat brain. *MAGMA*. 2004;17(3-6):109-16.
48. Yao H, Sadoshima S, Ooboshi H, Sato Y, Uchimura H, Fujishima M. Age-related vulnerability to cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 1991;22(11):1414-8.
49. Xu K, Sun X, Puchowicz MA, LaManna JC. Increased sensitivity to transient global ischemia in aging rat brain. *Adv Exp Med Biol*. 2007;599:199-206.
50. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47-60.
51. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58.

52. Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14385-90.
53. Foster TC. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca²⁺ channels in senescent synaptic plasticity. *Prog Neurobiol*. 2012;96(3):283-303.
54. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;36(1):60-90.
55. Gil-Mohapel J, Brocardo PS, Choquette W, Gothard R, Simpson JM, Christie BR. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. *PLoS One*. 2013;8(9):e75125.
56. Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, et al. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*. 2006;139(4):1173-85.
57. Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*. 2009;4(5):e5464.
58. Schoenfeld R, Moenich N, Mueller FJ, Lehmann W, Leplow B. Search strategies in a human water maze analogue analyzed with automatic classification methods. *Behav Brain Res*. 2010;208(1):169-77.
59. Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*. 1999;58(3):279-95.

60. Xu ZC, Gao TM, Ren Y. Neurophysiological changes associated with selective neuronal damage in hippocampus following transient forebrain ischemia. *Biol Signals Recept.* 1999;8(4-5):294-308.
61. Villarreal-Silva EE, Elizondo-Omaña RE, García-García A, Rodríguez-Rocha H, Quiroga-Garza A, Morales-Avalos R, et al. Stroke research and aging: an example of the discrepancy between basic and clinical research. *British Medical Journal* [Internet]. 2014. Available from: <http://www.bmj.com/content/348/bmj.g3387/rr/778514>.
62. Kunze A, Zierath D, Drogomiretskiy O, Becker K. Variation in behavioral deficits and patterns of recovery after stroke among different rat strains. *Transl Stroke Res.* 2014;5(5):569-76.
63. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin.* 2006;24(1):1-21.
64. Nikonenko AG, Radenovic L, Andjus PR, Skibo GG. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *Anat Rec (Hoboken).* 2009;292(12):1914-21.
65. Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron.* 1999;23(2):209-26.
66. Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(12):1586-95.

67. Speisman RB, Kumar A, Rani A, Foster TC, Ormerod BK. Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain Behav Immun.* 2013;28:25-43.
68. Bueters T, von Euler M, Bendel O, von Euler G. Degeneration of newly formed CA1 neurons following global ischemia in the rat. *Exp Neurol.* 2008;209(1):114-24.
69. Barros CA, Ekuni R, Moro MA, Pereira FM, Dos Santos Pereira MA, Milani H. The cognitive and histopathological effects of chronic 4-vessel occlusion in rats depend on the set of vessels occluded and the age of the animals. *Behav Brain Res.* 2009;197(2):378-87.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Resumen Autobiográfico.

El Dr. Eliud Enrique Villarreal Silva nació en la ciudad de Monterrey, Nuevo León el 15 de noviembre de 1986. Inició sus estudios universitarios en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde se graduó en julio 2009 con un promedio de 90.1 y mención por desempeño sobresaliente en su examen profesional. Realizó su servicio social en el Departamento de Anatomía Humana, donde al término de éste inició sus actividades docentes en el curso de Anatomía Humana desde agosto 2010 a la fecha.

En agosto 2011, inició posgrado en el programa de Doctorado en Medicina de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., donde obtuvo la distinción de estudiante sobresaliente durante el primer año de su posgrado. Actualmente se encuentra cursando el tercer año del posgrado con el proyecto de tesis titulado: "Caracterización del daño morfológico en el área CA1 del hipocampo y deterioro funcional secundario a isquemia cerebral global en ratas envejecidas".

Desde su formación de pregrado se interesó por la investigación en medicina participando en el Grupo de Investigación en Anatomía (GIA) del departamento

de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Desde abril de 2012 formó el Grupo de Investigación en Anatomía - Sistema Nervioso Central (GIA-SNC); grupo de investigación integrado por profesores y estudiantes de pregrado y posgrado, cuyo objetivo es la contribución en el conocimiento sobre neurociencias básicas y clínicas.

Hasta la fecha el Dr. Villarreal Silva tiene un total de 8 publicaciones en revistas indizadas en JCR y ha participado en la redacción de 4 capítulos de libros médicos. Próximamente en marzo de 2015 el Dr. Villarreal Silva iniciará su segundo posgrado en la especialidad de Neurocirugía en el Hospital Universitario de la U.A.N.L.