



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

**EFFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL Y EL APRENDIZAJE ESPACIAL
SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TRPV1 Y LA MORFOLOGIA
NEURONAL DEL CA1 DEL HIPOCAMPO DE RATA**

PRESENTA

pQFB ISABEL VÁZQUEZ JUÁREZ

DIRECTORES

DRA. MARÍA ISABEL MARTÍNEZ GARCÍA

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA

M.C FELIX LUNA MORALES

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA

FEBRERO 2014

ÍNDICE

Pág.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Isquemia cerebral	2
I.2 El Hipocampo	3
I.3 El receptor TRPV1	5
I.4 La expresión del receptor TRPV1	8
I.5 El receptor TRPV1 en la isquemia cerebral	9
I.6 El receptor TRPV1 y el aprendizaje espacial	12
I.7 Modelos que evalúan el aprendizaje y memoria espacial	14
I.8 Neurotrofinas	17
I.9 El 2, 3, 5-cloruro de trifeniltetrazolium (TTC)	18
I.10 Técnica de inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia	19
I.11 Golgi-Cox	19
I.12 Tinción de Nissl modificada	20

II. JUSTIFICACIÓN

21

III. HIPÓTESIS

22

IV. OBJETIVO GENERAL

22

IV.1 Objetivos particulares	22
-----------------------------	----

V. DIAGRAMA DE TRABAJO

23

VI. MÉTODO GENERAL

VI.1 Animales	24
VI.2 Oclusión de arteria carótida común izquierda	24
VI.3 Laberinto de Barnes	25
VI.4 Sesiones de entrenamiento	26
VI.5 Obtención de los cerebros	26
VI.6 Impregnación de las neuronas piramidales con la técnica de Golgi-Cox	26
VI.7 Tinción con 2, 3, 5-Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC)	27

VI.8 Técnica de Inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia	27
VI.9 Tinción de Nissl modificada	28
VI.10 Análisis histológico	29
VI.11 Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS	
VII.1 Evaluación de la zona isquémica con la tinción de TTC	31
VII.2 Evaluación del daño post-isquémico con la tinción de Nissl modificada	32
VII.3 Evaluación de la memoria espacial	33
VII.4 Evaluación de la memoria espacial representado en porcentaje	34
VII.4 Expresión del receptor TRPV1 en neuronas piramidales de CA1	36
VII.5 Cambios morfológicos en las neuronas piramidales	38
VII.6 Cambios morfológicos en las neuronas piramidales representado en porcentaje	41
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
IX. CONCLUSIONES	52
X. REFERENCIAS	53

I. INTRODUCCIÓN

Los accidentes cerebrovasculares son la primera causa de incapacidad permanente en la población adulta disminuyendo así su calidad de vida y son la tercera causa de muerte en países industrializados, se caracterizan por la aparición de déficits neurológicos, originando altos costos sociales y financieros siendo los de tipo isquémico los de mayor prevalencia (Prieto y cols., 2008; Ouh y cols., 2013). En México (2010) las enfermedades cerebrovasculares ocuparon el sexto lugar dentro de las principales causas de muerte con 32 306 defunciones, las mujeres representan el 52.5% y los hombres 47.5%. Afecta mayormente a personas de edad adulta, antes de los 55 años solo se concentran 12 defunciones de cada cien (entre los 25 y los 54 años) en tanto que el 87.7 % de los decesos corresponden a personas mayores a los 55 años, en las mujeres; a mayor edad mayor riesgo (Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Cerebrovasculares en México, 2010).

Recientemente se ha reportado que el consumo de drogas como la marihuana, la cocaína, el crack y las anfetaminas provoca accidentes cerebrovasculares (ACV) de tipo isquémico y hemorrágico en adultos jóvenes, el consumo de marihuana combinado con algunas otras drogas disminuyen el flujo sanguíneo cerebral siendo el accidente cerebrovascular de tipo isquémico más frecuente en las personas que consumen estas sustancias, cuando se consume cocaína y crack al mismo tiempo se observan hemorragias intraparenquimatosas y subaracnoideas, aunque predomina el AVC de tipo isquémico. Aproximadamente del 40 al 50% de los pacientes jóvenes que sufren un accidente cerebrovascular, padecen una patología vascular como la malformación cerebral arteriovenosa o un aneurisma cerebral, la ruptura de estos es más probable que ocurra cuando hay un incremento de la presión arterial y del gasto cardiaco debido al consumo de la cocaína combinado con el consumo elevado de alcohol. Además, el consumo de cocaína incrementa la agregación plaquetaria y ejerce efectos procoagulantes lo que favorece el infarto de miocardio e infarto cerebral, (Geibprasert y cols., 2010).

Reportes indican que la incidencia y las tasas de mortalidad por isquemia cerebral es menor en mujeres jóvenes y de mediana edad (pre-menopáusicas), debido a la acción de la hormona ovárica 17- β estradiol que ejerce efectos neuroprotectores ante el insulto isquémico (Inagaki y cols., 2012). Estudios en ratas adultas jóvenes han demostrado un efecto favorable de las hormonas ováricas en la lesión isquémica tras inducir la isquemia cerebral experimental, las ratas hembras presentan menor mortalidad y menos daño neuronal en comparación a las ratas macho y esta neuroprotección desaparece después de una ovariectomía (Alkayed y cols., 2000).

1.1 Isquemia cerebral

La isquemia cerebral se define como un proceso fisiopatológico caracterizado por la disfunción de una porción de tejido cerebral tras un periodo de falta de aporte de oxígeno, glucosa, aminoácidos, lípidos hormonas esteroideas como la progesterona, estradiol, glucocorticoides, insulina, iones y agua secundaria a la disminución del flujo sanguíneo en una arteria cerebral concreta. Existen dos tipos de isquemia cerebral; la global que afecta a todo el cerebro, suele aparecer tras un paro cardíaco y la isquemia focal, que solo afecta un territorio vascular y surge tras la oclusión de una arteria cerebral concreta. La isquemia no es homogénea en la zona afectada, se localiza un núcleo isquémico y una zona perifocal denominada penumbra isquémica, en la que se pueden desencadenar fenómenos tardíos de muerte celular (Prieto y cols., 2008).

La penumbra isquémica es una zona inestable desde el punto de vista energético, donde hay una disminución del flujo sanguíneo (20 ml/100g/min), a pesar de esto, aun esta preservado el metabolismo energético y la integridad de la membrana celular, la importancia de la penumbra isquémica radica en la hipótesis de que las neuronas localizadas en la periferia del infarto sobreviven al daño isquémico y pueden recuperarse cuando mejoren las condiciones hemodinámicas y se restaure el flujo sanguíneo cerebral que permita un aporte normal de glucosa y oxígeno (Arango-Dávila, 2008). En la isquemia cerebral transitoria, la estructura más afectada es el hipocampo en comparación con otras estructuras cerebrales,

tanto en animales como en humanos, se ha observado que dicha isquemia modifica la estructura dendrítica de las células piramidales de CA1 (Ruan y cols., 2006).

1.2 El Hipocampo

El hipocampo participa en procesos de aprendizaje y memoria, así como en desórdenes neurológicos como la epilepsia (Barth y Mody, 2011), es una estructura bilateral situada debajo de la neocorteza, en la superficie media basal del lóbulo temporal, se extiende desde la amígdala hasta el septum (figura 1A) y se divide en tres subcampos; CA1, CA2, CA3. El tipo celular más abundante en esta estructura son las células piramidales de naturaleza glutamatergica, en la figura 1B se observa la ubicación del *stratum pyramidal* en el cual se localizan los somas de estas neuronas (Taupin, 2007).

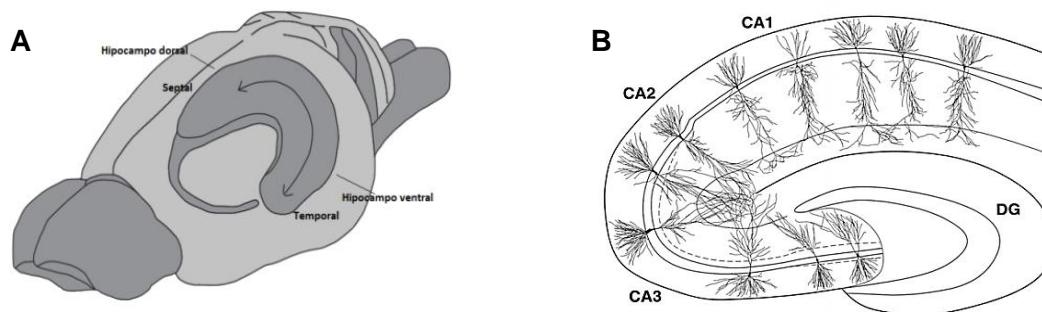


Figura 1. A) En la imagen se muestra la localización del hipocampo en el cerebro de rata. B) Organización de las células piramidales del CA1, CA2, y CA3 (Modificado de Witter y Amaral, 2004).

Los somas de las células piramidales son de forma triangular y su tamaño varía de acuerdo a la región; los de CA2 y de CA3 miden 40-60 μm , a diferencia de los de la región de CA1 que miden 20-40 μm . Del soma de una neurona piramidal de CA1 emergen 2 árboles dendríticos ramificados, las dendritas basales que ocupan el *stratum oriens* y las dendritas apicales localizadas en el *stratum*

radiatum (proximal apical) y el *stratum lacunosum-moleculare* (distal apical), (figura 2) (Amaral y Lavenex, 2007).

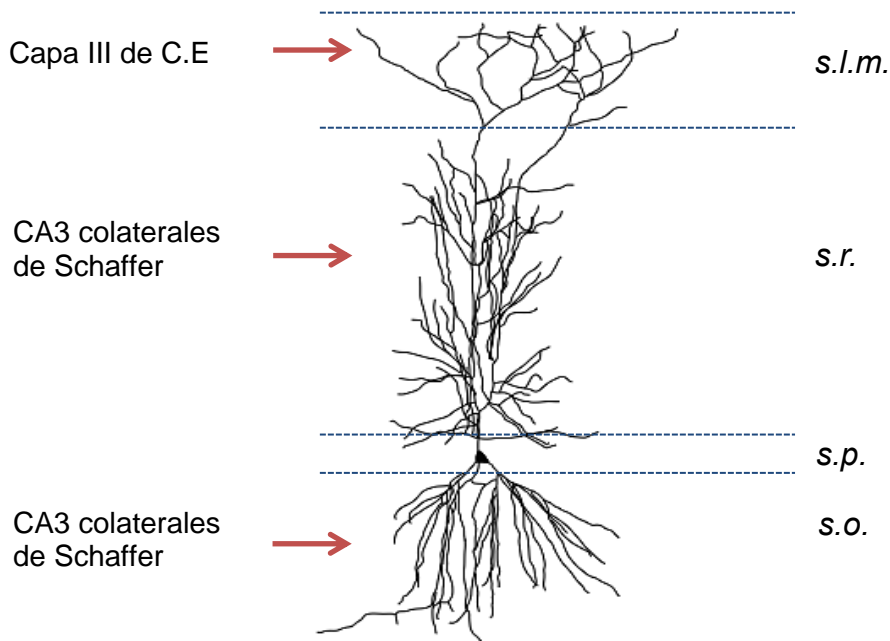


Figura 2. Morfología de una célula piramidal de CA1. *Stratum lacunosum-moleculare* (s.l.m), *stratum radiatum* (s.r.), *stratum pyramidale* (s.p.), *stratum oriens* (s.o.), (Modificado de Spruston y McBain, 2007).

La dendritas que se encuentran distribuidas en *stratum radiatum* ocupan el 40% del total de dendritas que conforman una neurona, reciben aferencias excitatorias a través de las colaterales de Schaffer, la densidad de espinas dendríticas es mayor en comparación con el *stratum oriens* y *stratum lacunosum moleculare* (Spruston y McBain, 2007).

En un estudio realizado en ratas Wistar macho a las que se les provocó una isquemia cerebral transitoria por oclusión de arterias carótidas durante 15 minutos, se evaluaron las alteraciones morfológicas en el CA1 del hipocampo en *stratum radiatum* después de la isquemia mediante microscopía electrónica, observando que a las 2 horas de la reperusión la densidad sináptica y las espinas estaban disminuidas, las espinas y las dendritas mostraban un aspecto hinchado, a las 24 horas de la reperusión observaron una disminución en los cuerpos neuronales en *stratum pyramidale* acompañado de la disminución de las espinas y

los contactos sinápticos en el *stratum radiatum*, a los 7 días de la reperusión se observa un máximo de muerte celular disminuyendo los contactos sinápticos y las espinas de las neuronas remanentes mostraron signos de degeneración, concluyendo que el *stratum radiatum* es altamente susceptible a sufrir alteraciones morfológicas tras una isquemia cerebral (Kovalenko y cols., 2006).

1.3 El receptor TRPV1

Investigaciones recientes indican la presencia del receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1 o TRPV1 en células piramidales de CA1 y CA3 del hipocampo, así como en otras estructuras cerebrales como se indica en la figura 3 y en la tabla 1. El receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1 (TRPV1) es un canal catiónico que permite el paso de diferentes cationes monovalentes o divalentes, pertenece a la familia de los receptores de potencial transitorio (TRP).

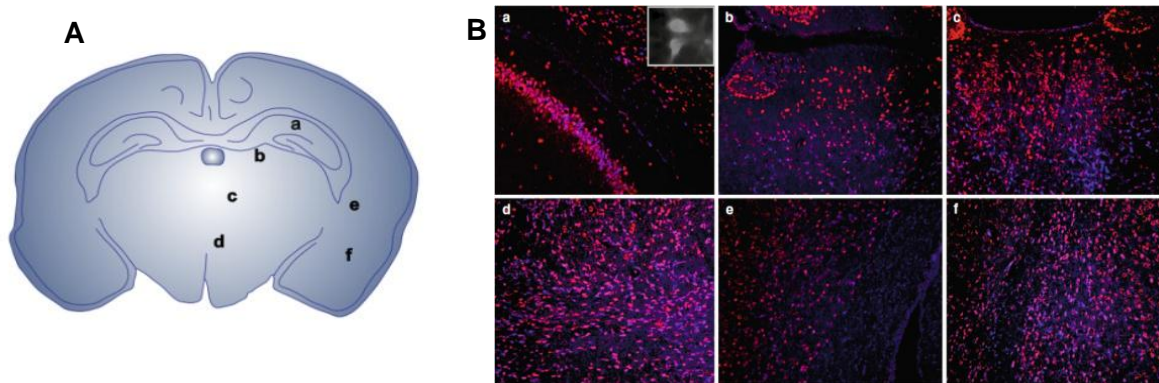


Figura 3. En A se observa la distribución del TRPV1 en un corte coronal de cerebro de una rata neonata; a (hipocampo), b,c,d (zona ventricular), e (estriado) y f (corteza). En B se muestran imágenes de doble inmunofluorescencia que muestra la inmunoreactividad del TRPV1 en color azul, marcador neuronal, NeuN en color rojo (Modificado de Khatibi y cols., 2011).

Estructuralmente es un tetrámero cuyas subunidades tienen 6 segmentos transmembranales y las regiones amino (N-) y carboxilo terminales (C-) son intracelulares. Los segmentos transmembranales S5 y S6 de cada subunidad junto con el asa que los une dan lugar al poro o vía de conducción iónica (*figura 4*), (Salazar y cols., 2009, Kauer y Gibson, 2009).

Tabla 1. Resumen de trabajos en los que se determinó la presencia del receptor TRPV1 en diferentes estructuras cerebrales empleando diversas técnicas.

<i>Autores</i>	<i>Técnica empleada</i>	<i>Estructuras cerebrales</i>
Mezey y cols. 2000	Inmunohistoquímica RT-PCR Histoquímica hibridación "in situ" (ISHH)	Rata: áreas corticales (en lamina 3 y 5), hipocampo, amígdala central, habenula central y medial, estriado, hipotálamo, núcleo talámico paraventricular y centromedial, sustancia nigra, formación reticular, locus coeruleus, cerebelo. Humano (post mortem): lamina 3 y 5 de corteza parietal.
Tóth y cols. 2005	Western Blot Inmunohistoquímica Inmunoelectronmicroscopia	Rata: hipocampo (cuerpos celulares y dendritas), astrocitos y pericitos, corteza, cerebelo, bulbo olfatorio, mesencéfalo, romboéncéfalo.
Cristino y cols. 2006	Inmunohistoquímica	Ratón: hipocampo (neuronas piramidales de CA1 y CA3), giro dentado, ganglio basal, tálamo, hipotálamo, pedúnculo cerebral, núcleo pontina, sustancia gris periacueductal, corteza cerebelar y núcleo cerebelar dentado.
Starowicz y cols. 2008	Inmunohistoquímica	Ratón: hipocampo (neuronas piramidales CA1-CA3) y cerebelo
Kauer y Gibson 2009	Fijación de voltaje	Ratón: hipocampo (neuronas piramidales de CA1 y CA3) y giro dentado.
Bennion y cols. 2011	PCR tiempo real (RT-PCR) cuantitativa	Rata: hipocampo (interneuronas de CA3-CA1).
Khatibi y cols. 2011	Inmunofluorescencia	Rata neonata: corteza, hipocampo, estriado y zona subventricular.
Han y cols. 2012	ELISA Inmunoprecipitación Western Blot Inmunofluorescencia	Rata: hipocampo corteza, hipotálamo y cerebelo.

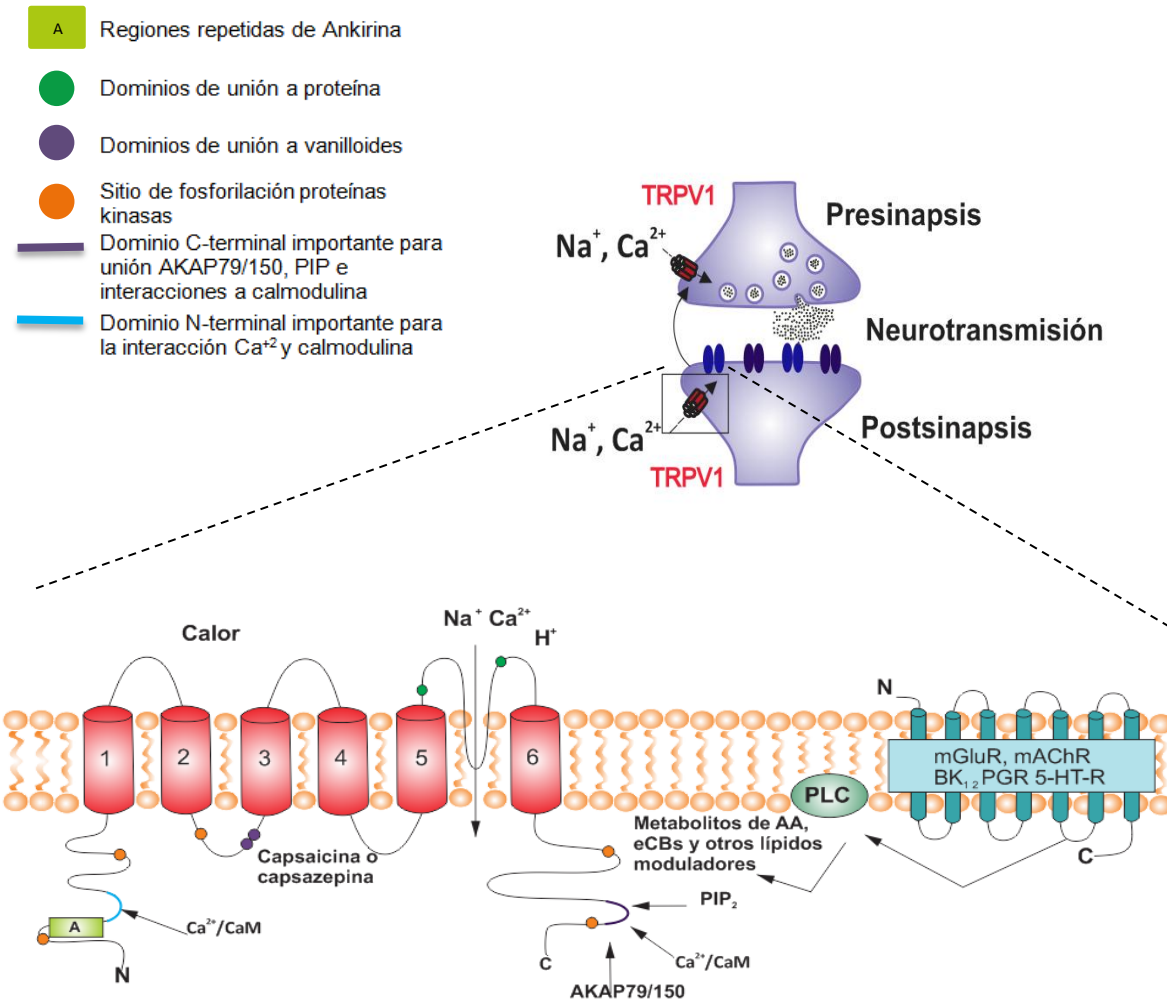


Figura 4. Diagrama de la estructura del receptor TRPV1, el extremo N-terminal tiene múltiples sitios repetidos de anquirina, sitios de unión a calmodulina, mientras que el extremo C-terminal consta de varias secuencias de consenso para proteínas quinasas, proteínas de interacción, segundos mensajeros, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) a través de la activación de fosfolipasa C, metabolitos del ácido araquidónico, endocannabinoides y otros lípidos que activan a este canal. Los sitios potenciales de unión a TRPV1 están localizados en las membranas pre y postsinaptica. Abreviaturas; 5-HT-R: receptor 5-hidroxitriptamina, AA: ácido araquidónico, BK: receptor bradiquinina, CaM: calmodulina, eCB: endocannabinoide, mAChR: receptor de acetilcolina muscarínico, mGluR: receptor de glutamato metabotrópico, PGR: receptor de progesterona, PIP: fosfatidilinositol fosfato, PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, PLC: fosfolipasa C (Modificado de Kauer y Gibson, 2009).

Los canales TRPV1 son altamente expresados en neuronas sensoriales primarias del ganglio trigeminal (par craneal 5) y participa como sensor de estímulos mecánicos, químicos y térmicos (Lübbert y cols., 2013), además el TRPV1 se expresa en el ganglio de la raíz dorsal del sistema nervioso periférico, así como en regiones del cerebro de mamíferos, se propone que participa en funciones como el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, la liberación de neurotransmisores, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y en la recuperación de la memoria espacial (Kauer y Gibson, 2009; Bennion y cols., 2011).

Investigaciones realizadas sobre el TRPV1 a nivel del sistema nervioso central indican que los ligandos lipídicos endógenos endovanilloides y endocannabinoides activan a este receptor; los más abundantes, la N-arachidonoil-dopamina (NADA), el ácido hidroperoxieicosatetranoico (HPETEs) y la anandamida (Kauer y Gibson, 2009, Starowicz y cols., 2008).

1.4 La expresión del receptor TRPV1

Se ha descrito que la expresión del receptor TRPV1 podría estar modulada por el factor de crecimiento nervioso (NGF), una posible vía es a través de la fosforilación mediada por Src-kinasa en Tyr-200, lo cual resulta en el incremento de la inserción del canal dentro de la superficie de la membrana celular (Pingle y cols., 2007)

El TrkA es un receptor tirosina kinasa que pertenece a la familia de los receptores a neurotrofinas, presenta alta afinidad y especificidad por el factor de crecimiento neuronal (NGF), tras la activación del receptor TrkA por el NGF se propone que se activan las vías p38 MAPK, PLC γ y PI3K e inducen el aumento de la movilización de TRPV1 del retículo endoplásmico a la superficie de la membrana celular incrementando así la expresión del TRPV1, movilización que es independiente de la transcripción, un posible mecanismo involucrado en la regulación hacia arriba del TRPV1 es el incremento de la fosforilación del factor traslacional eIF4E (Pingle y cols., 2007; Stein y cols., 2006; Zhang y cols., 2005).

Se propone que la regulación de la expresión génica del TRPV1, es a través de los factores de transcripción Sp1, Sp4 y el factor de crecimiento nervioso (NGF), los cuales incrementan la actividad del promotor P2 y se da inicio a la transcripción de RNA de TRPV1, cuando el NGF está aumentado hay un incremento en la expresión del mRNA de TRPV1 (Chu y cols., 2011). También se ha descrito que el factor de crecimiento derivado de la glía (GDGF) y la neurotrofina 3 (NT3) incrementan la expresión del TRPV1 en neuronas sensoriales (Vennerkens y cols., 2008)

1.5 El receptor TRPV1 en la isquemia cerebral

Estudios recientes han mostrado que los cambios patológicos en el cerebro como el aumento en la temperatura 38.4°C (Mrozek y cols., 2012) y pH 6.5 (Yao y Haddad, 2004; Xiong y Xu, 2010) después de un infarto cerebral pueden influir sobre la actividad del TRPV1, ya que este receptor participa de manera importante en los eventos ocurridos después de la isquemia, como la modulación de la liberación de glutamato, se ha sugerido que este canal podría contribuir a la muerte neuronal, ya que puede ser activado por compuestos endógenos como anandamida y productos de la lipooxigenasa los cuales se acumulan durante el daño cerebral (Pegorini y cols., 2005).

En un estudio realizado en Gerbos machos, a los cuales se les provoco una isquemia cerebral global transitoria por oclusión de arterias carótidas comunes durante 10 minutos, evaluaron la participación del receptor TRPV1 en la isquemia cerebral con la administración subcutánea de capsaicina a diferentes dosis (0.01, 0.025, 0.05, 0.2 y 0.6 mg/Kg) 5 minutos después de la recirculación y capsazepina a dosis de 0.01 mg/kg 15 minutos antes de la oclusión, a los 7 días de la reperusión obtuvieron los cerebros y realizaron cortes coronales del hipocampo de 5 µm de espesor y que fueron teñidos con la tinción de violeta de cresilo, los resultados obtenidos mostraron que los Gerbos con isquemia cerebral y administrados con capsaicina (0.2 mg/kg) mostraron un aumento en la sobrevivencia de las células piramidales del hipocampo de hasta un 80%, (*figura 5C*) efecto atribuido por la desensibilización del receptor (Pegorini y cols., 2005).

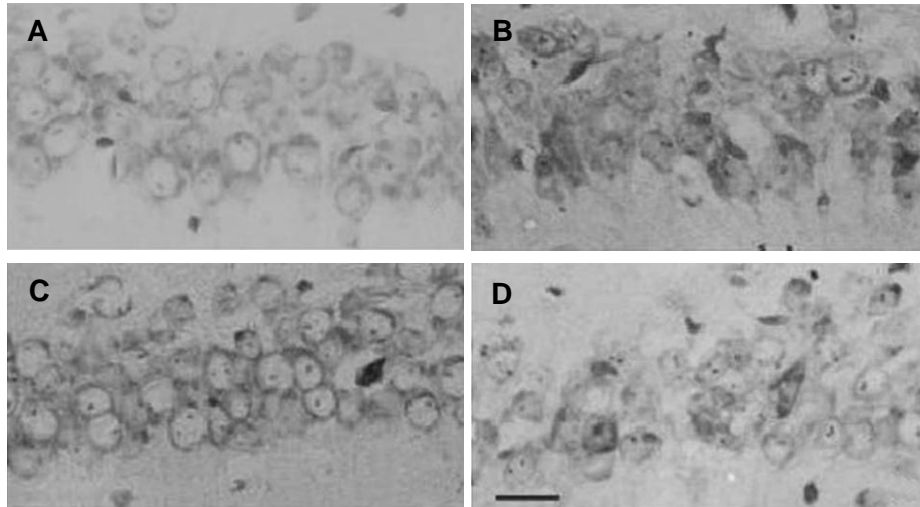


Figura 5. Fotografías de la región de CA1 del hipocampo de cerebros de Gerbos con isquemia de 10 minutos y sin isquemia evaluada 7 días después de la oclusión. A) Animal sham. B) Animal isquémico tratado con vehículo 5 minutos después de la recirculación. C) Animal tratado con capsaicina (0.2 mg/kg) 5 minutos después de la recirculación D) Animal tratado con capsazepina (0.01 mg/kg) y capsaicina. Barra= 50µm. Tinción de violeta de cresilo, (Modificado de Pegorini y cols., 2005).

Estudios recientes han mostrado que agonistas del receptor TRPV1 como la capsaicina proporcionan un efecto neuroprotector contra la excitotoxicidad y la lesión cerebral isquémica, por la desensibilización del receptor TRPV1, empleando un modelo de lesión cerebral neonatal hipoxico-isquémico (HI) en ratas de 10 días de edad, por ligación permanente de arteria carótida común derecha seguido de 2 horas de hipoxia, evaluaron el efecto de la activación del receptor TRPV1, 3 horas pre HI o 1 hora post-HI administrando por vía intraperitoneal capsaicina (0.2 mg/kg o 2.0 mg/kg), concluyendo que tras activación del receptor TRPV1, 3 horas antes de la hipoxia-isquemia hay una reducción en el volumen de infarto y en los cambios apoptóticos en la arteria cerebral media distal (*figura 6 y 7*), (Khatibi y cols., 2011).

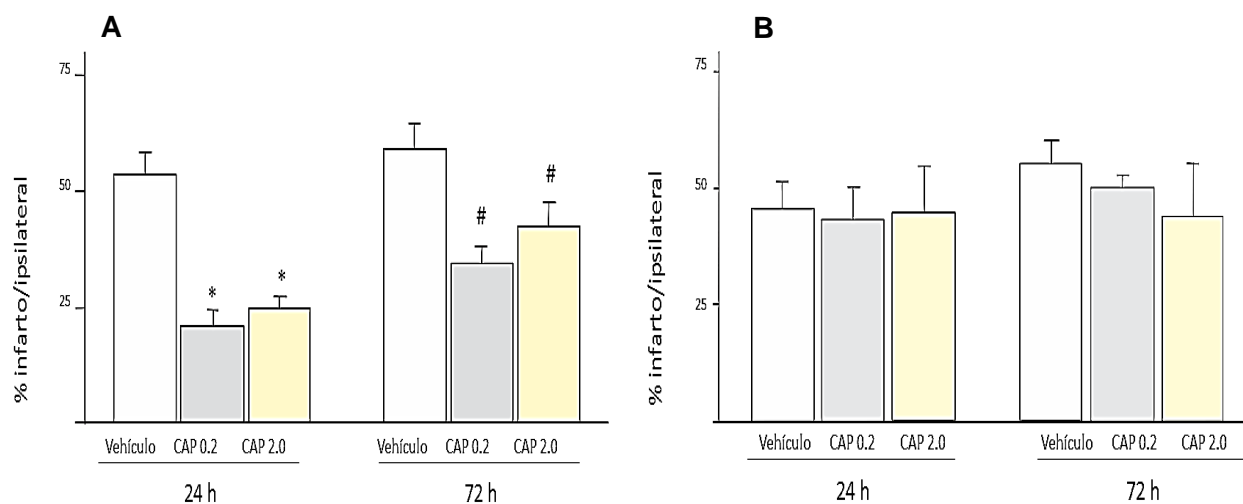


Figura 6. A) Gráfica de barras muestra la cuantificación del volumen de infarto calculado de la tinción TTC de cortes coronales de cerebro de grupos pre-tratamiento, vehículo, capsaicina 0.2 mg/kg y 2.0 mg/kg. B) gráfica de barras muestra las mismas pruebas que en 6A con post tratamiento de 1 hora, (Modificado de Khatibi y cols., 2011).

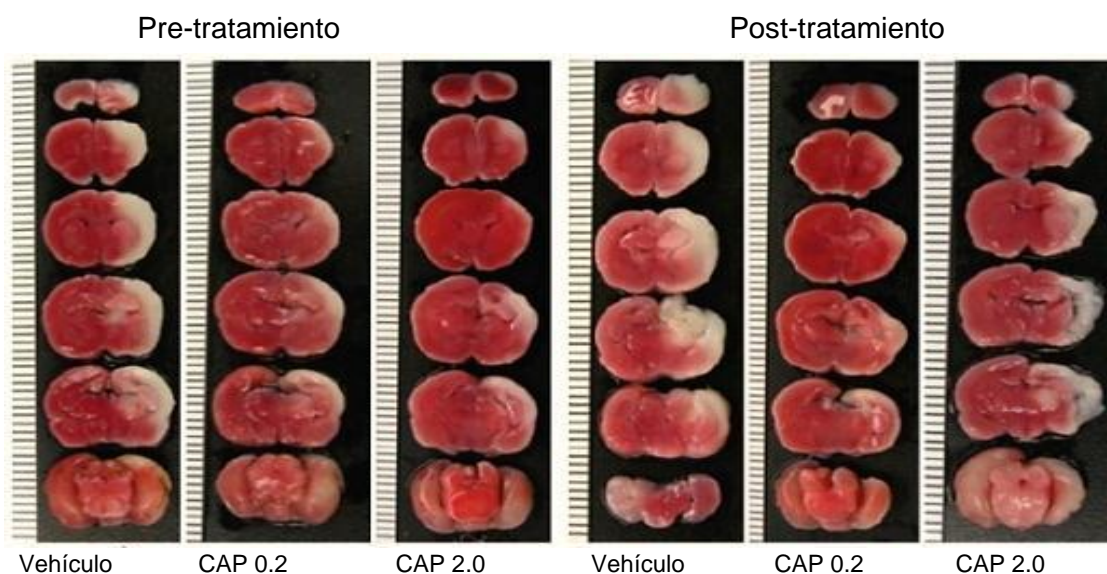


Figura 7.- Cortes coronales de cerebros teñidos con TTC, cortes de 1mm de grosor, pre y post tratamiento con capsaicina, (Modificado de Khatibi y cols., 2011).

Los estudios realizados por Pegorini y colaboradores (2005) y Khatibi y colaboradores (2011), indican la participación del receptor TRPV1 durante la isquemia cerebral, inicialmente contribuye a la muerte neuronal por excitotoxicidad

generada por la liberación excesiva de glutamato, tras la activación repetida del TRPV1 por los mediadores fisiopatológicos, productos de la ruptura de la membrana celular, endocannabinoides y pH bajo, conduce a la desensibilización del receptor que protege a las neuronas, disminuyendo la excitotoxicidad, por consiguiente se observa menor daño neuronal y los procesos motores y cognitivos no se ven deteriorados.

1.6 El receptor TRPV1 y el aprendizaje espacial

Los neurofisiólogos definen el aprendizaje espacial como el proceso por medio del cual adquirimos nuevos conocimientos acerca de los eventos que ocurren a nuestro alrededor a través de la conducta exploratoria, una conducta instintiva y ampliamente conservada en todas las especies animales incluyendo el hombre. Este tipo de comportamiento puede ser considerado como una expresión de la curiosidad natural o puede representar la necesidad de adquirir información cuando los sujetos se enfrentan a un nuevo entorno y nuevos estímulos por lo tanto, la memoria espacial se puede definir como la función del cerebro responsable de reconocer, codificar, almacenar y recuperar información espacial acerca de la disposición de los objetos o rutas específicas. Se ha propuesto que la información puede almacenarse mediante cambios anatómicos entre las conexiones de las neuronas debido a un incremento sostenido en la comunicación sináptica llamada potenciación a largo plazo (LTP), siendo ampliamente aceptada como modelo de plasticidad sináptica que subyace del almacenamiento de información, (Balderas y cols., 2004; Carrillo-Mora y cols., 2009). La LTP consiste en dos fases distintas que implican distintos mecanismos moleculares, la primera LTP temprana (E-LTP) que dura 2-3 h y es independiente de la síntesis de proteínas mientras que la LTP tardía (L-LTP) varios días e incluso semanas y requiere de la síntesis de proteínas (Lynch, 2004).

Li y colaboradores (2008), examinaron el efecto de la activación del receptor TRPV1 en la LTP y LTD en cortes de hipocampo tomados de ratas macho Wistar, por estimulación de las colaterales de Schaffer registraron los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) basales en el *stratum*

radiatum en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, posteriormente administraron Capsaicina (1 mmol/L) o resiniferatoxina (1 μ mol/L), 30 minutos después indujeron la LTP por estimulación de alta frecuencia (HSF) y observaron un gran aumento en la LTP usando ambos agonistas (figura 8 A), la LTD fue bloqueada (figura 8 B).

Para corroborar estos datos utilizaron Capsazepina (100 μ mol/L) y SB366791 (10 μ M) notaron que estos antagonistas no aumentan la inducción de la LTP tras la estimulación de alta frecuencia y al mismo tiempo no mostraron tener efecto en la LTD tras la estimulación de baja frecuencia. Estos resultados sugieren la participación del TRPV1 en la LTP.

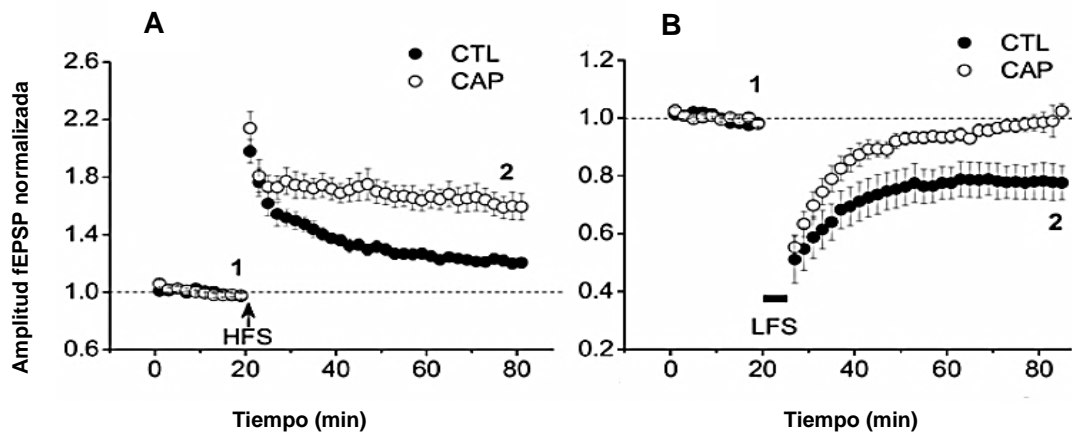


Figura 8. Agonistas del TRPV1 facilitan la LTP y suprimen la LTD en el hipocampo. A) Estimulación de alta frecuencia (HSF: 100 Hz) induce la LTP, cuando es aplicado el baño de solución con capsaicina (1 mmol/L) 30 minutos antes de la HSF, indujo una larga LTP comparado con el basal o el control. B) Estimulación de baja frecuencia (LFS; 3 Hz) induce la LTD, la capsaicina aplicada 30 minutos antes de LSF previene la LTD inducida por la LSF (Modificado de Li y cols., 2008).

Un posible mecanismo para explicar la participación del receptor TRPV1 en la potenciación a largo plazo es que al ser activado por ligandos endógenos regula la señalización a través de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) que favorece la expresión de genes sumado a esto, se encuentra la participación de los receptores NMDA, ambos fenómenos conducen a la facilitación de la LTP, sin la activación del TRPV1 la vía de señalización es débil lo que conduce a la facilitación de la LTD (Li y cols., 2008).

En un estudio emplearon cortes coronales de cerebros de ratas macho Sprague Dawley, registraron los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs) basales en *stratum radiatum* en células piramidales de CA1 del hipocampo mediante la estimulación de las colaterales de Schaffer y en seguida colocaron Capsaicina (1 μ M) agonista del TRPV1, observando un aumento en la LTP cuando es comparado con el control-vehículo DMSO (*figura 9A*), Para confirmar que la capsaicina indujo el aumento de la LTP, posteriormente administraron Capsazepina (10 μ M) antagonista del TRPV1 y observaron que la LTP fue bloqueada (*figura 9B*), (Bennion y cols., 2011).

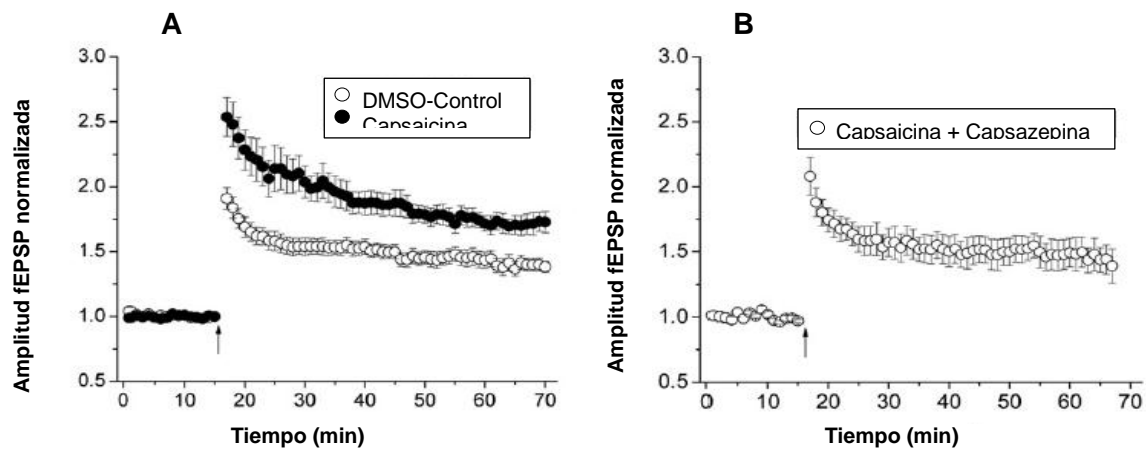


Figura 9. La activación del receptor TRPV1 incrementa la potenciación a largo plazo en células piramidales de CA1 del hipocampo. A) La capsaicina agonista de TRPV1 incremento significativamente la LTP, inducida por el ritmo theta (flecha), comparado con el vehículo (DMSO 0.1%), se midieron los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs). B) Capsazepina, antagonista del TRPV1 bloqueo significativamente el aumento inducido por capsaicina de la LTP por ritmo theta (flecha) regresando a sus niveles, no hay diferencia significativa con respecto a su control DMSO (Modificado de Bennion y cols., 2011).

1.7 Modelos que evalúan el aprendizaje y memoria espacial

Los laberintos son los dispositivos más empleados para la evaluación de la memoria espacial en roedores aunque no los únicos, los roedores son alimentados o privados de alimento y agua, el principio fundamental para el uso de estos aparatos se basa en que los roedores deben aprender y recordar la ubicación que

les proporciona seguridad, alimentos, agua o alguna otra recompensa (reforzadores de comportamiento) por medio de señales visuales.

Laberinto radial

El dispositivo original fue concebido con 8 rutas lineales o brazos que confluyen en el centro, se coloca alimento en cada uno de los brazos, el animal se coloca en el centro del laberinto y se deja elegir libremente los brazos que contienen alimento hasta que todos los pellets sean recogidos, la estrategia óptima implica un número mínimo de visitas a los brazos vacíos o visitar un brazo solo una vez, este laberinto ha sufrido distintas modificaciones desde aumentar 9 brazos (en total 17) y la de añadir señales visuales que indiquen la localización del alimento. Los animales deben ser privados de alimento o agua por varias horas, se ha descrito que la velocidad de aprendizaje podría estar relacionada con el tiempo de privación el cual debe ser planificado de acuerdo a los límites establecidos por la especie o cepa elegida. Algunos medicamentos (bloqueadores colinérgicos, anfetaminas) pueden inducir episodios anoréxicos afectando la conducta en el laberinto y esto debe tomarse en cuenta al diseñar un protocolo experimental, el proceso de adquisición es más lento por ello se requieren más ensayos. Dentro de las ventajas de usar estos laberintos es que se pueden adaptar a diferentes necesidades experimentales, se pueden emplear tanto ratones como ratas y tiene la ventaja de generar solo un nivel moderado de estrés en los animales durante las pruebas. Algunas desventajas de este laberinto es que los roedores pueden o no usar las señales visuales y solo guiarse por el olor del alimento.

Laberinto acuático de Morris

Este dispositivo consta de una piscina redonda llena de agua opaca, la opacidad se puede obtener con diferentes sustancias: leche en polvo, pintura blanca, dióxido de titanio. En el interior de la piscina hay una plataforma de escape poco visible que se encuentra (2-3 cm) bajo el agua. El protocolo para el estudio de la memoria espacial incluye la división imaginaria de la piscina en cuatro cuadrantes iguales. El experimento comienza con un periodo de habituación durante el cual

los animales se sumergen en el agua y se les deja nadar durante unos minutos sin la plataforma, más tarde se coloca una plataforma en posición fija en uno de los cuadrantes y los animales pasan por un periodo de adquisición durante el cual se les da un numero variable de pruebas diarias para encontrar la plataforma. Al comienzo de cada ensayo los animales se colocan en diferentes posiciones de partida. El tiempo que se tarda el animal para encontrar la plataforma de escape (latencia) se registra y se le permite a la rata permanecer de 30-60 segundos en la plataforma para favorecer el aprendizaje, los ensayos deben ser grabados para documentar las trayectorias que los animales siguieron. Después del entrenamiento la memoria es evaluada en un ensayo adicional, durante este ensayo de prueba la plataforma debe ser removida.

Algunos factores que influyen en este laberinto es el peso corporal, la condición física y la edad que influyen en la velocidad de nado, varios estudios han mostrado que animales macho se desarrollan mejor cuando son comparados con hembras efecto atribuido no solo a la fuerza física sino a la habilidad de navegación espacial. Se ha descrito que las diferencias en el rendimiento espacial entre hembras y machos se debe a los niveles de hormonas gonadales, se han encontrado diferencias en el rendimiento espacial en este laberinto entre las diferentes especies, cepas o incluso animales transgénicos, lo que permite un estudio más detallado de los factores que influyen en los procesos de aprendizaje.

El laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes consta de un disco plano con un número de agujeros alrededor de su perímetro que permiten asignar una salida del laberinto hacia la caja de escape, se utilizan estímulos aversivos como la luz blanca o ruidos mayores a 80 db, la tarea se basa en la preferencia innata de los roedores por espacios oscuros cerrados por encima de áreas más abiertas, en donde se encuentra localizada la caja de escape, los sujetos de estudio aprenden la ubicación de un agujero de escape utilizando puntos de referencia espacial que se fijan en relación al laberinto, el éxito del laberinto se ejemplifica cuando los animales sometidos a esta tarea hacen uso de señales intra y extra-laberínticas

mostrando un rendimiento mucho mejor que los entrenados sin señales espaciales.

Sin embargo, tanto el laberinto de Barnes como el laberinto acuático de Morris pueden estar influenciados por un número de factores no cognitivos tales como ansiedad, inmovilidad, o actividad exploratoria, tales factores se deben considerar a la hora de evaluar la tarea de memoria espacial. El laberinto de Barnes y el laberinto acuático de Morris son dos tareas que miden la capacidad de un roedor de aprender y recordar una zona destino mediante una configuración de señales visuales situadas alrededor de la zona de pruebas, se ha sugerido que el laberinto de Barnes es menos ansiogénico comparado con el laberinto acuático de Morris, el aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes se evalúa contando el tiempo que el sujeto emplea para encontrar la caja de escape, así como número de errores antes de encontrar la caja (Harrison y cols., 2006; Harrison, y cols., 2008; Navarrete y cols., 2008; Carrillo-Mora y cols., 2009).

1.8 Neurotrofinas

Las neurotrofinas son proteínas identificadas como factores de sobrevivencia, tal es el caso del factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neuronal derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), son expresados en mamíferos. Su función es promover la sobrevivencia neuronal y diferenciación celular, regulando el desarrollo y la función neuronal, incluyendo la formación de la sinapsis y la plasticidad sináptica, a través de la activación del receptores tirosina kinasa (Reichardt, 2006). Se ha visto que durante la isquemia cerebral se activa la microglia la cual libera al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) para disminuir la lesión isquémica y promover la actividad fagocítica de elementos degenerados (Jiang y cols., 2010), en particular el BDNF se sabe que juega un papel importante en la potenciación a largo plazo (LTP) una forma de plasticidad sináptica que se cree es la base de la formación de la memoria a largo plazo.

El BDNF induce la expresión de genes en la población neuronal del hipocampo como el de la proteína Arc que es producto de un gen de respuesta inmediata encargado de la regulación dinámica del citoesqueleto de actina que subyace de la potenciación a largo plazo (LTP), actividad que contribuye a la plasticidad sináptica y el almacenamiento de la memoria (Pisu y cols., 2011).

1.9 El 2, 3, 5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

El TTC se utiliza con frecuencia para la identificación macroscópica del tejido viable con respecto al tejido infartado, permite localizar y medir el tamaño del infarto y delimita las lesiones isquémicas (Isayama y cols., 1991). El TTC es incoloro y es reducido enzimáticamente a rojo de formazan por acción de deshidrogenasas, las cuales son muy abundantes en la mitocondria, la intensidad de la tinción se correlaciona con el número y actividad funcional de las mitocondrias (Benedek y cols., 2006). El TTC al ser un marcador de la deshidrogenasa tisular y de la disfunción mitocondrial, permite evaluar el daño cerebral, la ausencia de tinción con TTC es considerada área infartada por la disminución de la actividad de las deshidrogenasas o su ausencia y la zona teñida de rojo es la zona viable (Liu y cols., 2008).

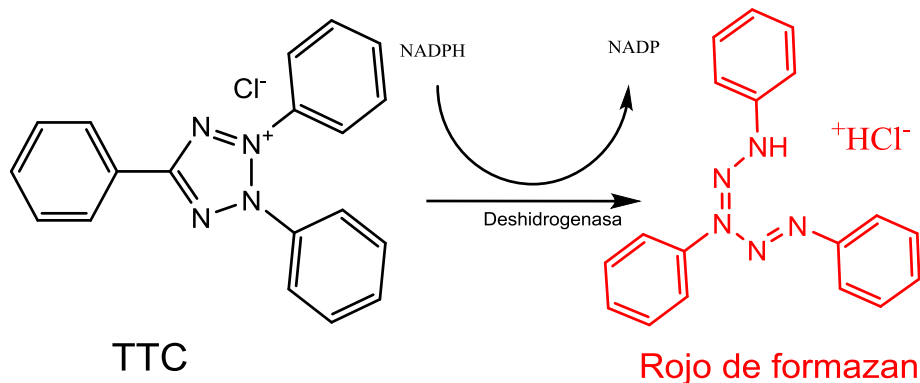


Figura 10. Se muestra la reducción enzimática del compuesto de TTC.

1.10 Técnica de inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia

Las técnicas de inmunofluorescencia utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales marcados con un colorante fluorescente para poder ser detectados (fluoroforo), puede ser directa cuando el fluoroforo se une directamente al anticuerpo específico (anticuerpo primario), mientras que la indirecta utiliza un anticuerpo anti-inmunoglobulinas (anticuerpo secundario) marcado con el fluoroforo para detectar el anticuerpo específico (no marcado). La exposición de las preparaciones a la luz ultravioleta bajo el microscopio de fluorescencia, excita la fluorescencia que emite luz a una longitud de onda característica capturada por un filtro selectivo (Regueiro, 2002). Esta técnica permite identificar antígenos (proteínas) de superficie en células o tejidos, es altamente sensible, incrementa la amplitud de la señal debido a la cantidad de anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo primario, además de la disponibilidad comercial de los anticuerpos y de los colorantes permite obtener resultados óptimos (Zambrano, 2007),

1.11 Golgi-Cox

La tinción de Golgi- Cox es ampliamente utilizada debido a que revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones, permite observar y agrupar a las neuronas de acuerdo a sus características morfológicas, mediante la visualización del soma y la disposición de las dendritas, esta técnica mejora la calidad de las preparaciones neurohistológicas, los cortes más gruesos permiten observar mejor la morfología tridimensional de todos los componentes neuronales de ratas jóvenes y adultas (Torres, 2006). Es una modificación de la técnica cromo-argéntica realizada por W. Cox a la técnica propuesta por Camilo Golgi. La solución está compuesta por una mezcla de dicromato de potasio y cloruro de mercurio, a la que se le agrega cromato de potasio para incrementar la reacción ácida de la solución. Los depósitos de mercurio o probablemente complejos oxidados de mercurio metálico en la célula permiten obtener buenos resultados en la impregnación de neuronas del área de hipocampo (Alvarado, 2005; Ranjan y Mallick, 2010). El dicromato de potasio y cloruro de mercurio son usados como

fijadores que incrementan la probabilidad de la impregnación (Koyama y Tohyama, 2012).

1.12 Tinción de Nissl modificada

Esta tinción nos permite visualizar el número, el tamaño e incluso la forma de diversas poblaciones neuronales, en las diferentes estructuras cerebrales, sirve como un marcador de daño neuronal crónico (Liu y McCullough, 2011), es un método basado en la interacción de colorantes básicos como el violeta de cresilo, tionina, azul de toluidina, azul de metileno o anilina con el ácido nucleico contenido en la célula, estos colorantes se unen al DNA contenido en la célula pero también al RNA que es altamente concentrado en el retículo endoplásmico rugoso y ribosomas (sustancia Nissl) en el citoplasma, dado que las neuronas son células muy activas que sintetizan proteínas contienen una alta concentración de retículo endoplásmico rugoso, debido a esta característica especial de las neuronas, la tinción de Nissl específicamente tiñe el citoplasma de las neuronas (Kádár y cols., 2009).

II. JUSTIFICACIÓN

La isquemia cerebral es una de las principales causas de incapacidad permanente en la población adulta, se caracteriza por la aparición de déficits motores y cognitivos (Prieto y cols., 2008). En 2010 México ocupó el sexto lugar dentro de las principales causas de muerte con 32 306 defunciones, la mortalidad prevalece en las mujeres con un 52.5% con respecto a los hombres con 47.5%, afectando mayormente a personas mayores de 55 años (Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Cerebrovasculares en México, 2010), siendo las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo las más afectadas durante éste proceso (Ruan y cols., 2006). Por otro lado, se sugiere que en las neuronas localizadas en la penumbra isquémica se instauran mecanismos celulares para la recuperación de las funciones neuronales (Arango-Dávila, 2008). También se ha reportado que el receptor TRPV1, que está implicado en la facilitación de la potenciación a largo plazo (LTP) mecanismo de plasticidad neuronal propuesto como base molecular del aprendizaje (Li y cols. 2008; Bennion y cols. 2011,) así mismo, se sabe que durante la isquemia cerebral ocurren numerosos procesos entre ellos la desensibilización del TRPV1 que protege a las neuronas de la excitotoxicidad (Pegorini y col., 2005; Khatibi y cols., 2011) y la activación de la microglia, la cual libera al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Jiang y cols. 2010) que juega un papel importante en la LTP (Pisu y cols., 2011). Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, consideramos relevante determinar si existe relación entre la expresión del receptor TRPV1 y la morfología neuronal de las células piramidales de CA1 del hipocampo de ratas con isquemia cerebral focal entrenadas en el laberinto de Barnes.

III. HIPOTESIS

La expresión del receptor TRPV1 favorece los cambios morfológicos en la longitud dendrítica, número de dendritas y número de espinas dendríticas en neuronas piramidales del CA1 del hipocampo de ratas isquémicas entrenadas en el laberinto de Barnes.

IV. OBJETIVO GENERAL

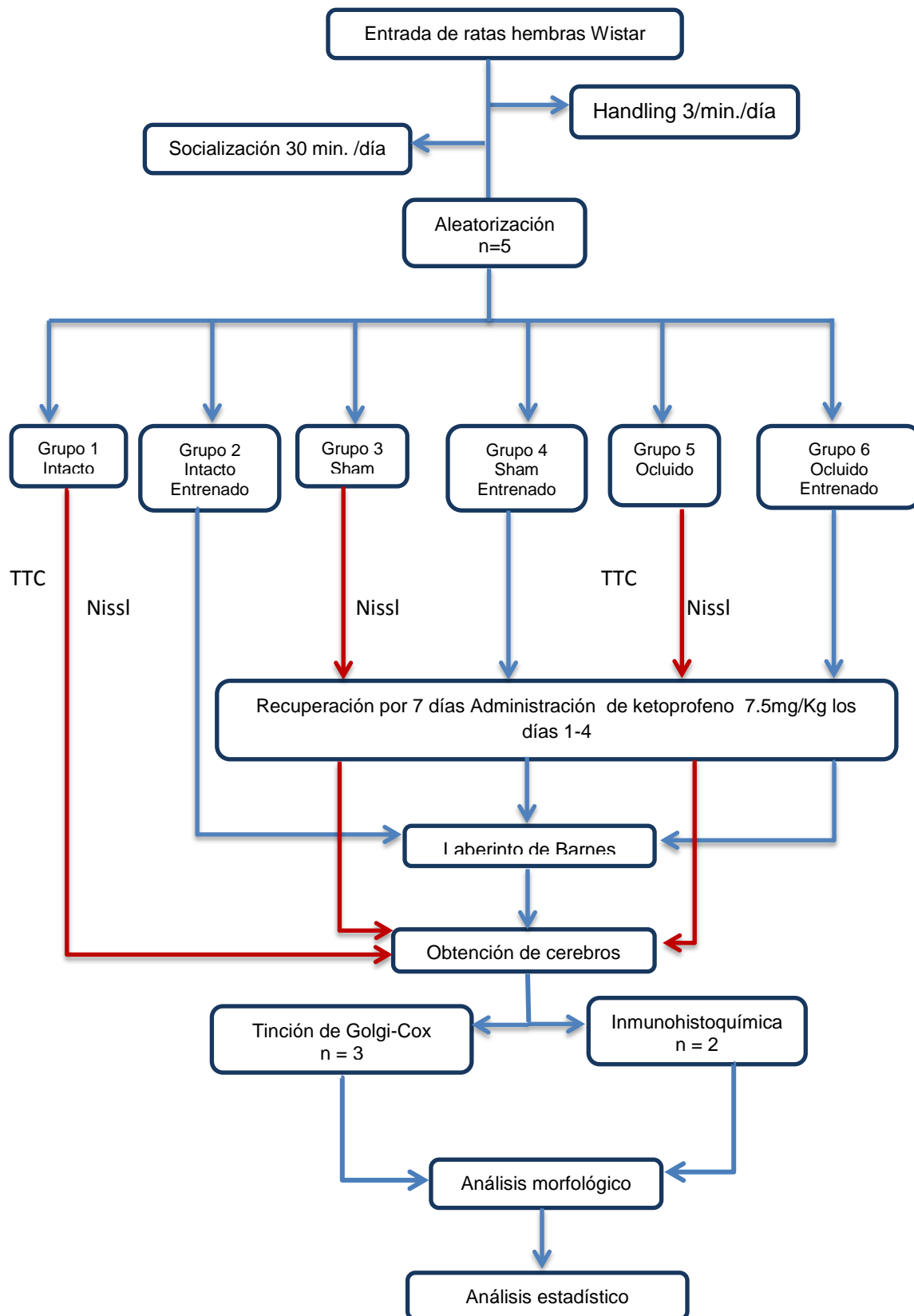
Determinar si existe relación entre la expresión del receptor TRPV1 y cambios morfológicos: longitud dendrítica, número de dendritas y espinas dendríticas en el stratum radiatum de neuronas piramidales del CA1 del hipocampo de ratas con isquemia cerebral y aprendizaje espacial.

IV.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Determinar el efecto de la isquemia cerebral y del aprendizaje espacial sobre la expresión del receptor TRPV1 en neuronas del CA1 del hipocampo mediante inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia.

- II. Determinar el efecto de la isquemia cerebral y del aprendizaje espacial sobre la longitud dendrítica, el número de dendritas y número de espinas dendríticas en *stratum radiatum* de células piramidales del CA1 por medio de la tinción de Golgi-Cox.

V. DIAGRAMA DE TRABAJO



VI. MÉTODO GENERAL

VI.1 Animales

Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar provenientes del bioterio *Claude Bernard* de la BUAP, fueron alojadas en el vivario del laboratorio de Neuroquímica en cajas individuales de acrílico con agua y alimento *ad-libitum*, ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad de $50 \pm 10\%$. El manejo de los animales se realizó bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que indica las "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio", (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001). La experimentadora fue capacitada y certificada en el "Manejo y vías de administración en ratas de laboratorio" así como en los "Principios de anestesia, analgesia y cirugía en ratas de laboratorio" por el personal acreditado del bioterio *Claude Bernard*.

VI.2 Oclusión de arteria carótida común izquierda

La rata fue administrada con ketoprofeno a una dosis de 7.5 mg/kg por vía subcutánea, transcurridos 10 minutos se anestesió con una mezcla de ketamina/xilacina, dosis 85 mg/kg y 16 mg/kg respectivamente vía intraperitoneal una vez anestesiada se colocó en decúbito supino sobre la zona quirúrgica, se realizó una incisión en la línea media del cuello, seguido de la separación lateral de los músculos esternocleidomastoideos hasta encontrar la carótida izquierda, la cual fue ocluida con una pinza Johns Hopkins durante una hora. Se permitió que los animales se recuperaran durante 7 días con los cuidados post-operatorios que consistieron en la administración de ketoprofeno (7.5 mg/kg) durante 4 días por vía subcutánea, revisión diaria de la incisión, peso diario de los animales, así como la verificación de la ingesta de agua y alimento.

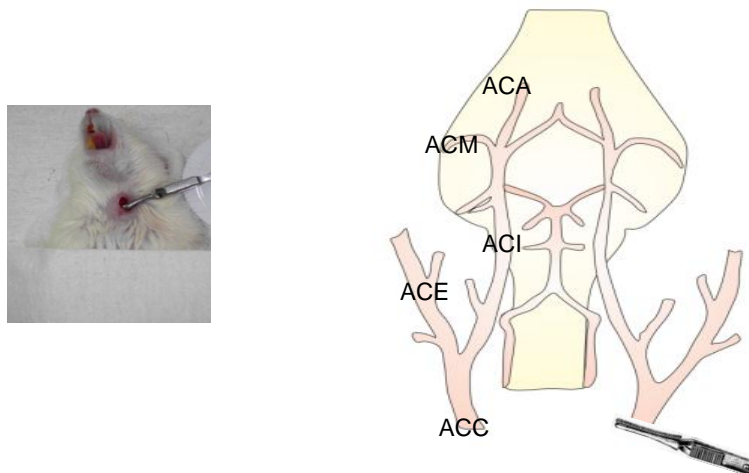


Figura 11. Modelo de oclusión de arteria carótida común izquierda en rata. ACC; Arteria carótida común, ACE; Arteria carótida externa, ACI; Arteria carótida interna, ACM; Arteria cerebral media, ACA; Arteria cerebral anterior (Modificado de Prieto y cols., 2008).

VI.3 Laberinto de Barnes

Consta de una plataforma circular de acrílico blanco de 1 m de diámetro, 90 cm de alto, con 18 orificios en la periferia de 8.5 cm de diámetro, los orificios se encuentran abiertos excepto el agujero de escape, en el cuál se encuentra la caja de escape que está elaborada de acrílico negro, sus dimensiones son 9.5 cm de ancho, 18 cm de largo y 9 cm de altura. Se utilizó una lámpara de luz blanca como estímulo aversivo, la zona de experimentación estuvo aislada de sonidos externos y se emplearon 4 señales extra laberínticas distribuidas en los 4 puntos cardinales, como se observa en la figura 10.



Figura 12. Imágenes muestran el laberinto de Barnes del laboratorio de Neuroquímica.

VI.4 Sesiones de entrenamiento

Los animales de estudio se colocaron en el área habituación durante 30 minutos antes de iniciar la primera sesión de entrenamiento, la superficie del laberinto se limpió con solución alcohólica al 30%, posteriormente se colocó al sujeto de experimentación en el centro del laberinto cubriéndolo con la caja oscura durante 10 segundos, mientras la rata permaneció dentro de la caja, la luz se mantuvo apagada, al finalizar el tiempo establecido se retiró la caja y la lámpara se encendió, se le dieron a la rata 180 segundos para encontrar la caja de escape. Se registró el tiempo de latencia para encontrar la caja de escape y el número de errores cometidos antes de encontrar la caja de seguridad. Los animales recibieron 4 ensayos por día con 5 minutos de descanso entre cada ensayo; del 1 al día 3 se consideró la fase de entrenamiento y el día 4 la evaluación de la memoria a largo plazo.

VI.5 Obtención de los cerebros

Una vez terminados los experimentos conductuales, las ratas se sacrificaron con pentobarbital sódico a una dosis de 45 mg/kg y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina isotónica (SSI), paraformaldehído al 4% en PBS (PBS-F) o paraformaldehído, dependiendo del grupo al que pertenezcan los animales, posteriormente fue decapitado y se extrajo el cerebro con ayuda de una gubia.

VI.6 Impregnación de las neuronas piramidales con la técnica de Golgi-Cox

Los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución salina isotónica (SSI), después de obtener los cerebros se lavaron con agua destilada e inmediatamente, se sumergieron en 15 ml de solución Golgi-Cox durante 14 días en oscuridad, haciendo un cambio de la solución a los 7 días. Transcurridos los 14 días los cerebros se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron en 10 ml de sacarosa al 30% por 14 días en oscuridad, se hizo un cambio de solución de sacarosa a los 7 días, se obtuvieron cortes coronales de 200 μ m, se fijaron en portaobjetos previamente gelatinizados al 2%, las laminillas se mantuvieron en

cámara húmeda (solución alcohólica 1:2 con agua destilada) en oscuridad. Para el revelado, se sumergieron las laminillas en agua destilada durante 5 minutos, posteriormente en hidróxido de amonio al 30% por 30 minutos, se enjuagaron con agua destilada por 5 minutos y se colocaron en fijador kodak al 50 % por 30 minutos seguido de un último enjuague con agua destilada por 5 minutos. La deshidratación del tejido se realizó en concentraciones crecientes de etanol al 50%, 70%, y al 95% por 5 minutos cada uno, finalmente en alcohol absoluto por 5 minutos, realizando este lavado dos veces, utilizando alcohol nuevo en cada lavado, posteriormente se sumergieron en xileno 15 minutos y por último se cubrió el tejido con resina sintética (al 60% en Xilol) con un cubreobjetos y se guardaron en oscuridad (3-4 días), los cortes se observaron en microscopio óptico de campo claro a 10x.

VI.7 Tinción con 2, 3, 5-Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC)

Esta tinción se le realizó a un cerebro de una rata intacta y en un cerebro de una rata con oclusión de arteria carótida común izquierda, los animales se perfundieron con buffer de fosfatos salino (PBS), el cerebro se colocó en una solución fría (0 a 4°C) de PBS, se obtuvieron cortes coronales de 200 µm (Vibratomo Leica VT1000S) los cuales fueron sumergidos en solución de TTC al 1%, y se incubaron (Baño María Riossa B-40) por 30 minutos a 37° C en oscuridad, transcurrido el tiempo de incubación, los cortes se enjuagaron 3 veces con PBS, posteriormente se colocaron en paraformaldehído al 4% por 30 minutos, al finalizar el tiempo indicado los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados al 2% y se procedió a fotografiar los cortes y realizar el análisis macroscópico.

VI.8 Inmunohistoquímica para el receptor TRPV1

Los animales fueron perfundidos con solución salina isotónica (SSI) seguido de paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4, se obtuvieron los cerebros y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4, un día antes de que se obtuvieran los cortes, se colocaron los tejidos en soluciones de sacarosa en concentraciones de

10, 20 y 30% durante 1 hora respectivamente, posteriormente se conservaron los tejidos en refrigeración (4°C) hasta que se realizaron los cortes de 5 µm de espesor en el micrótopo, los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados al 3%.

Se colocaron los tejidos en agua destilada durante 5 minutos, se enjuagaron con buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 por 5 minutos, la recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos 10 mM, pH 6 y se incubó en baño María a 65°C durante 20 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los cortes se permeabilizaron con PBS-Triton-100X al 2% por 10 minutos, para el bloqueo del marcaje inespecífico se utilizó albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T, los cortes se colocaron dentro de una cámara húmeda durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, seguido de 2 lavados en PBS-T por 5 minutos. Posteriormente se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario diluido en PBS-T (Anti-TRPV1 Millipore 1:100), por 18 horas en cámara húmeda cerrada a 4 °C, se lavaron 3 veces en PBS-T por 5 minutos, se incubaron con el anticuerpo secundario (Anti-anti-TRPV1-FITC 1:250), diluido en PBS-T por 2 horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegido de la luz, se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS-T y un lavado por 3 min con PBS. Para teñir núcleos se utilizó Ioduro de Propidio en PBS 1:1000 por 2 minutos, se realizaron 2 lavados por 5 minutos con PBS agitando suavemente, y 2 lavados por 5 minutos con agua bidestilada y finalmente se lavó 1 vez por 5 minutos con PBS-T, por último se colocaron los cubreobjetos con fluido de fluorescencia y se observaron en el microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara obteniendo así las fotografías que se analizaron con el programa NIH ImageJ.

VI.9 Tinción de Nissl modificada

La tinción se realizó a un cerebro del grupo intacto, a uno del grupo sham y a uno del grupo ocluido. Las ratas fueron perfundidas con paraformaldehído, seguido de la obtención del cerebro, se realizaron cortes coronales de 100 µm que se fijaron en laminillas previamente gelatinizadas al 2% y colocados en una cámara húmeda hasta su tinción. Los cortes se hidrataron con agua destilada por

20 minutos, se procedió a colocar el tejido en azul de cresilo al 1.5% durante 30 minutos, se eliminó el exceso del colorante con un lavado de 5 minutos en agua destilada, seguido de la deshidratación del tejido por diferentes gradientes de etanol: 50, 70, 95 y 100% por 5 minutos cada uno, para finalizar se colocaron las laminillas en xileno durante 10 minutos, se aplicó una capa de resina sintética al 60% en xileno y finalmente se cubrieron con cubreobjetos.

VI.10 Análisis histológico

Se analizaron neuronas del CA1 del hipocampo las células elegidas fueron fotografiadas empleando una cámara digital (Cannon Power Shot S80) acoplada a un microscopio de campo claro a 10x (Zeiss Axiostar plus). Las neuronas elegidas para ser fotografiadas debían estar bien impregnadas, no fragmentadas y con pocos precipitados. A cada neurona fotografiada se le evaluaron los siguientes parámetros: longitud dendrítica, número de dendritas y número de espinas dendríticas/10 μm en el *stratum radiatum*. La longitud dendrítica y el número de dendritas fueron medidas con el programa Motic Image plus 2.0.

Para la inmunoreactividad del receptor TRPV1 la observación y el análisis de las laminillas con el corte coronal se realizaron por microscopia de inmunofluorescencia con un microscopio Leica DM100 acoplado a una cámara y las imágenes fueron observadas y capturadas a 10x y 40x con ayuda del programa IM50 para PC, posteriormente se analizaron mediante el programa NIH ImageJ.

VI.11 Análisis estadístico

El análisis del tiempo de latencia y número de errores en el laberinto de Barnes se realizó con una ANOVA de kruskal-Wallis, los datos de las células TRPV1⁺ se sometieron a una ANOVA de Friedman. El análisis de los datos de longitud dendrítica, número de dendritas y número de espinas de los grupos intacto, sham, ocluido con y sin entrenamiento fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples post hoc Tukey, para todos los grupos experimentales una $p < 0.05$ fue considerada significativa. El

análisis estadístico se hizo con el programa STATISTICA 8 y las gráficas fueron editadas con el programa GraphPad Prism 5.

VII. RESULTADOS

VII.1 Evaluación de la zona isquémica con la tinción de TTC

Para poder verificar el daño en la región del CA1 del hipocampo, generado por la oclusión de la arteria carótida común izquierda, 48 horas después de la oclusión se sacrificó a una rata del grupo intacto y a una rata del grupo con oclusión, se obtuvieron los cerebros y se realizaron cortes de 200 μm de espesor los cuales fueron sometidos a la tinción de TTC. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos.

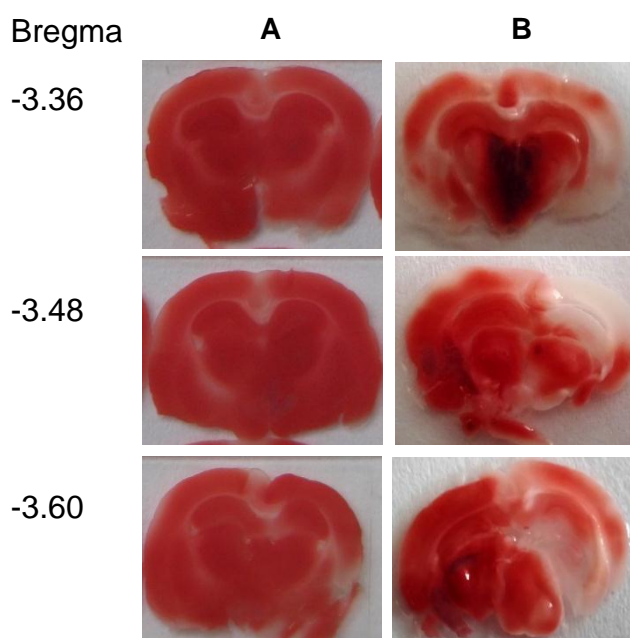


Figura 13. Determinación cualitativa del daño isquémico producido por la oclusión de la arteria carótida común izquierda con la tinción de 2, 3, 5-cloruro de trifetil tetrazolio (TTC). En A se muestran cortes coronales obtenidos del cerebro de una rata que no sufrió daño isquémico y en B cortes coronales del cerebro de una rata con daño isquémico el cual muestra una zona blanquecina que indica muerte neuronal en el CA1 del hipocampo.

VII.2 Evaluación del daño post-isquémico con la tinción de Nissl modificada

Para poder evaluar las diferencias en la población neuronal de CA1 del hipocampo del cerebro de una rata intacta, sham y con oclusión se realizó la tinción de Nissl modificada, los resultados se muestran en la figura 14.

-3.48 Bregma

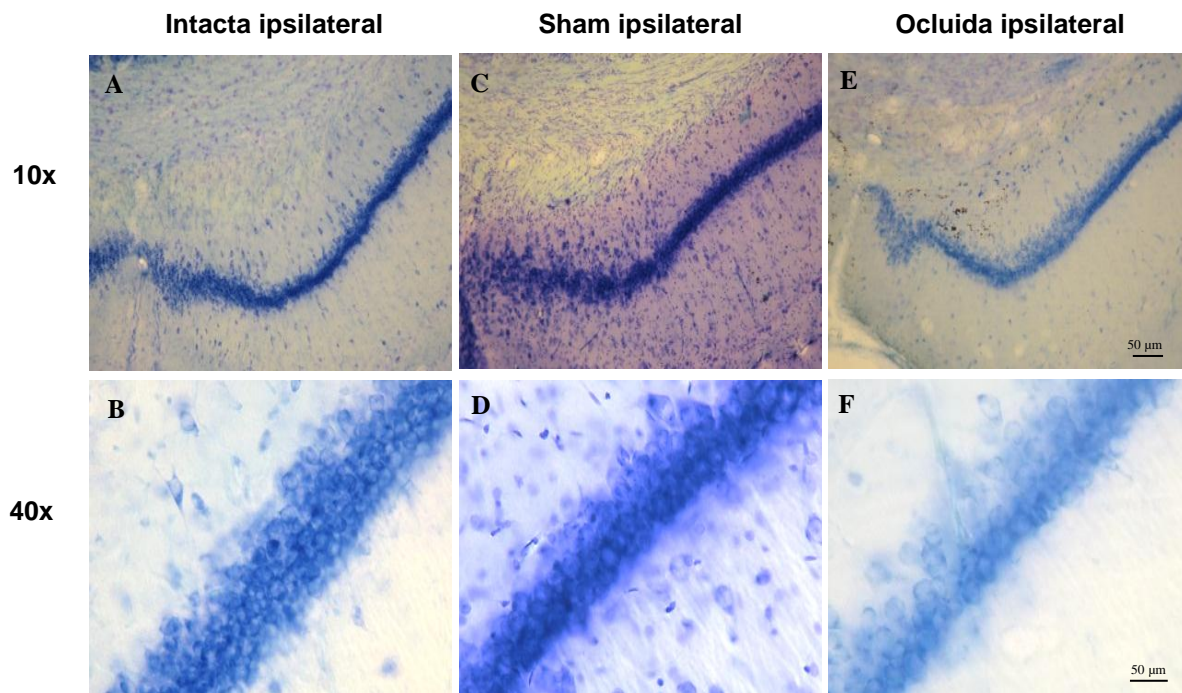
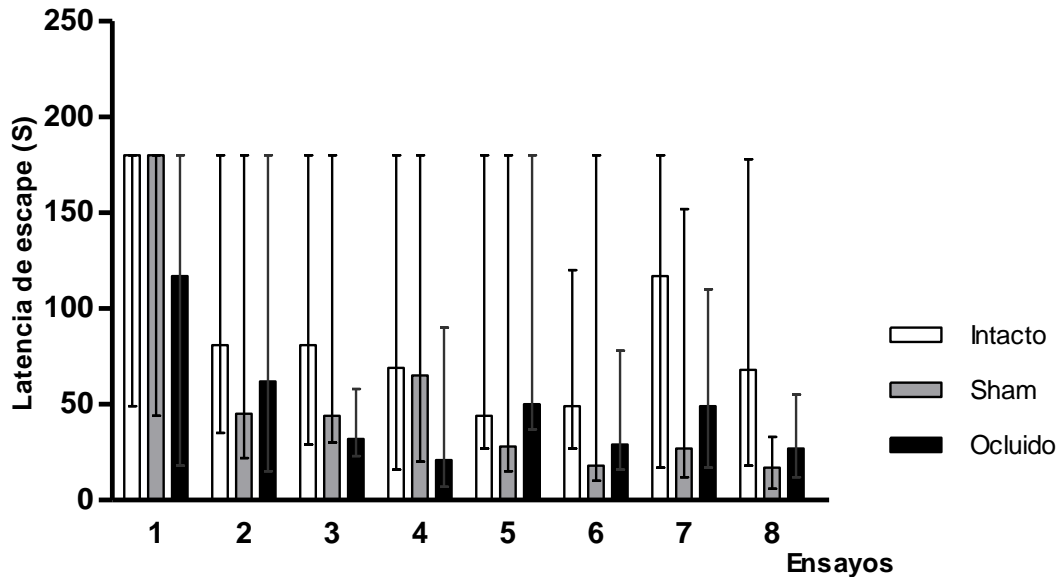


Figura 14. Población neuronal de la región de CA1 del hipocampo de rata. A y B muestran la distribución de la población neuronal de una rata sin isquemia cerebral, C y D de una rata sham, E y F de una rata con isquemia cerebral. Fotografías tomadas con una cámara digital (Canon Power Shot S80) acoplada a un microscopio de campo claro a 10x y 40x (Zeiss Axiostar plus).

VII.3 Evaluación de la memoria espacial

Las gráficas muestran la variación en las medianas de los tiempos de latencia de escape de los grupos experimentales intacto (n=5), sham (n=5), ocluido (n=5) durante los 16 ensayos realizados.

A)



B)

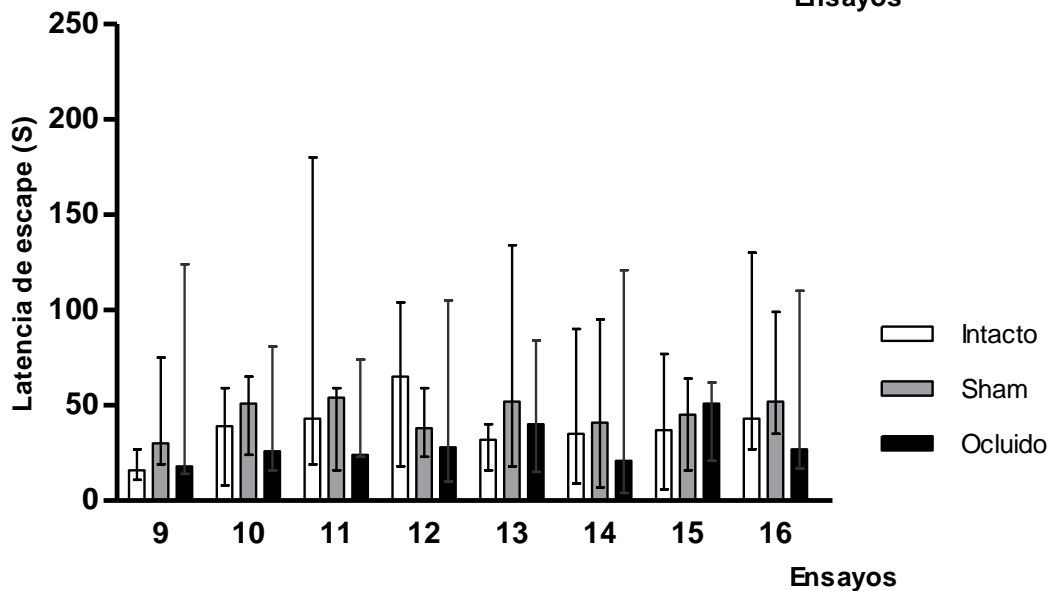


Figura 15. Las gráficas A y B muestran la variación de las medianas de la latencia de escape en el laberinto de Barnes expresados en segundos durante todos los ensayos realizados, se presenta la evolución de cada uno de los grupos a lo largo de los 16 ensayos. (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$), no se encontró diferencia significativa.

VII.4 Evaluación de la memoria espacial representada en porcentaje

El porcentaje se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{a - b}{a + b}\right) \times 100$$

Dónde:

a: es el tiempo máximo asignado para la localización de la caja de escape 180s.

b: el tiempo de latencia obtenido en cada ensayo

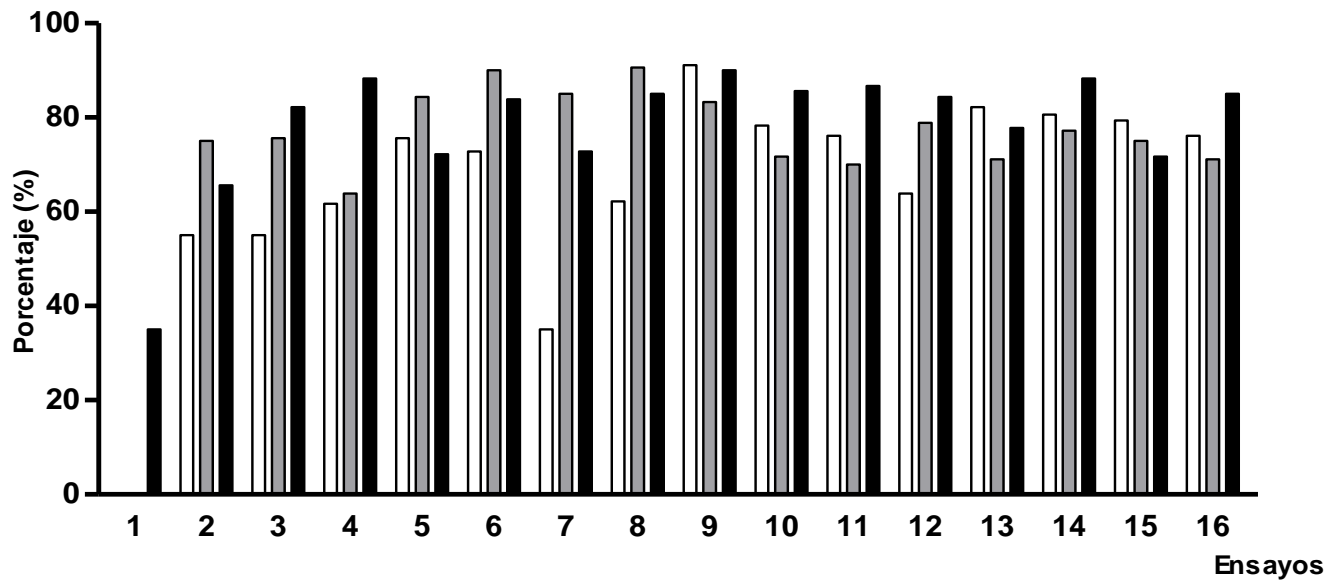


Figura 16. Grafica que representa la latencia de escape en porcentaje obtenido por los grupos: intacto, sham y ocluido a lo largo de los 16 ensayos. La barra color blanco representa al grupo intacto, la barra gris al grupo sham y la barra de color negro al grupo ocluido.

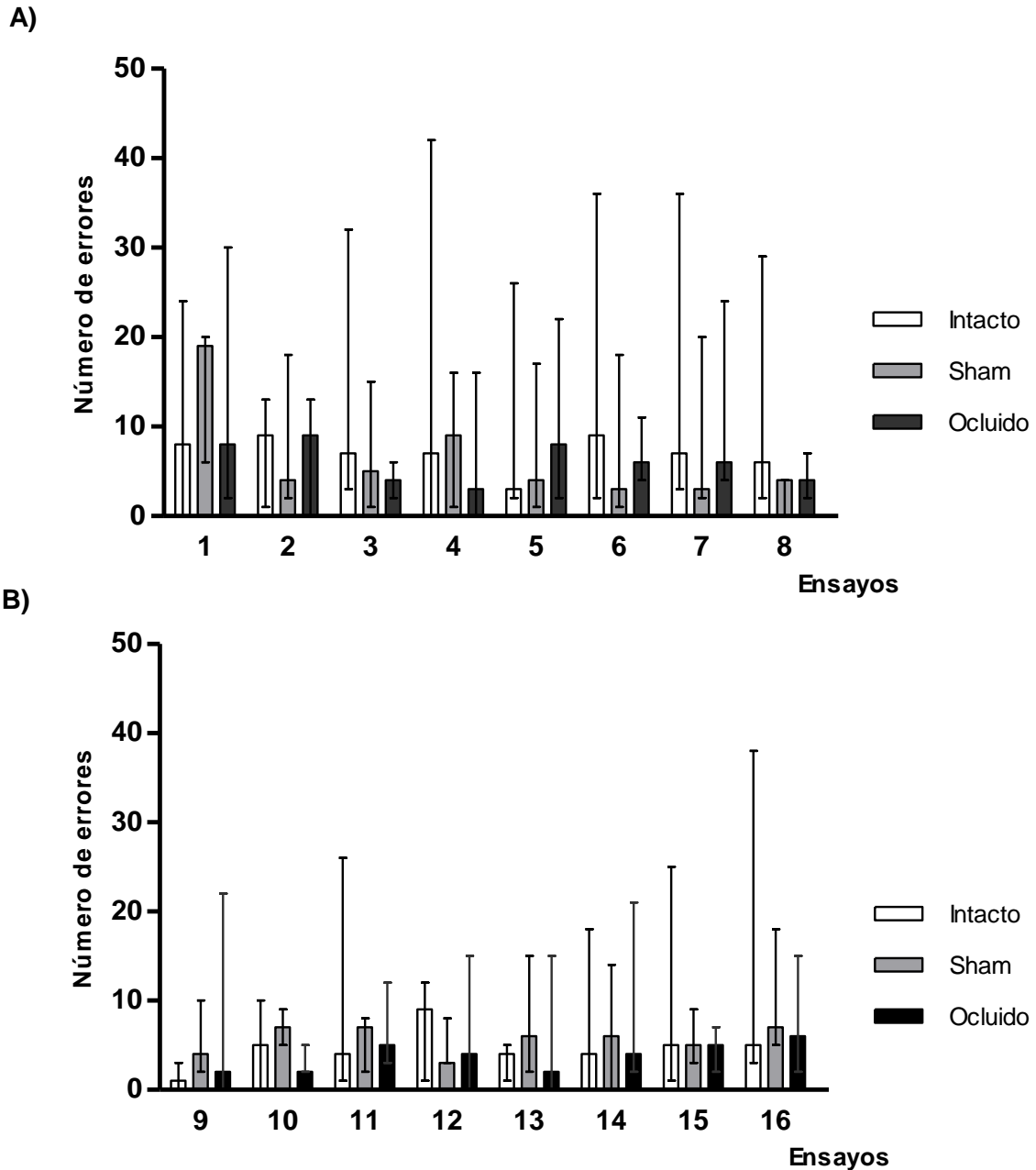


Figura 17. Las gráficas A y B muestran la variación de las medianas del número de errores antes de encontrar la caja de seguridad en el laberinto de Barnes. En este parámetro se tomó en cuenta las veces que el animal visitó agujeros que no tenían caja de escape, se presenta la evolución de cada uno de los grupos a lo largo de los 16 ensayos, (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$), no se encontró diferencia significativa.

VII.5 Expresión del receptor TRPV1 en neuronas piramidales de CA1

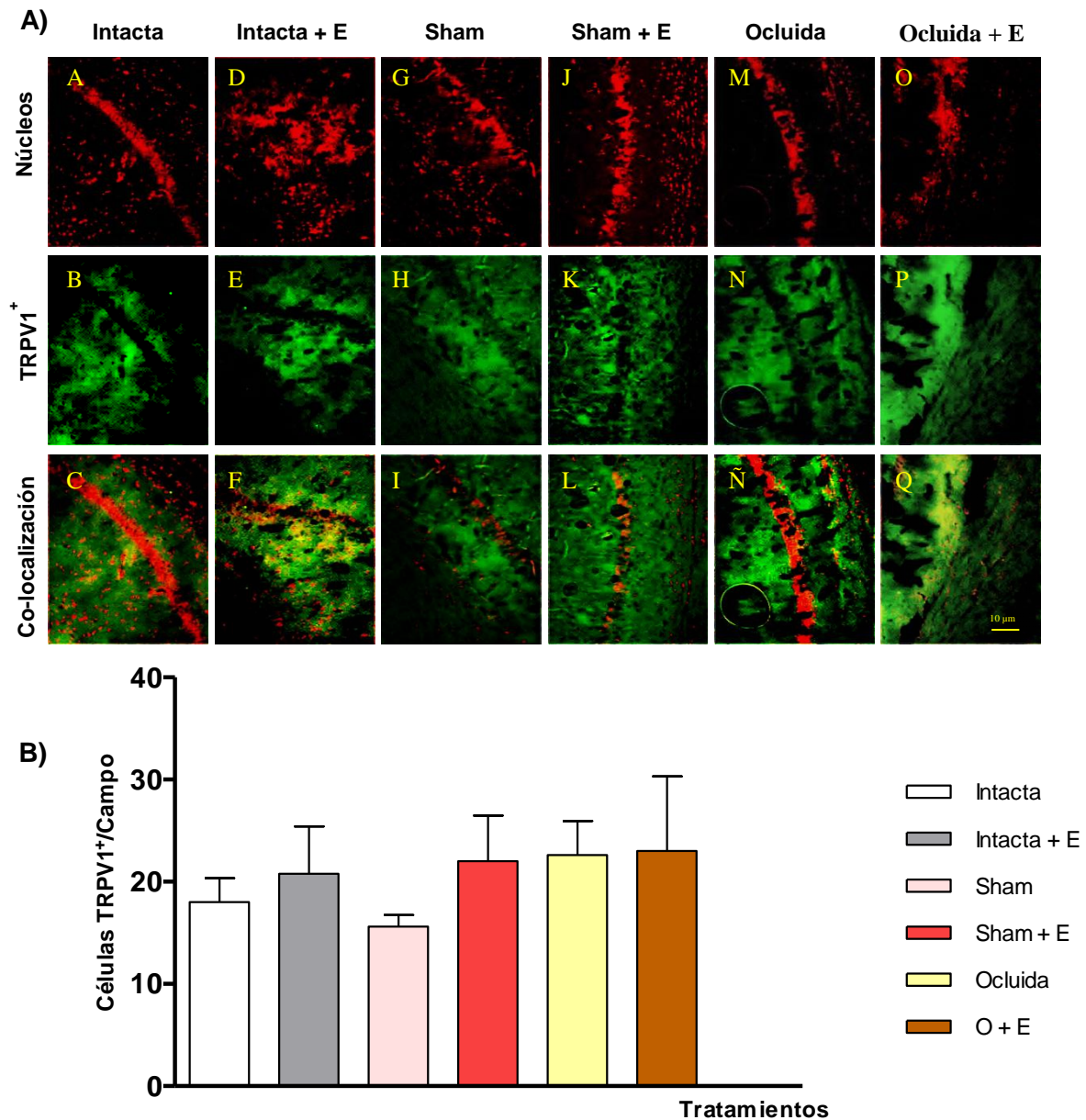


Figura 18. En A se muestra imágenes de la inmunohistoquímica de los receptores TRPV1 en el CA1 del hipocampo a 10x. En la primera fila se observan los núcleos neuronales en rojo marcados con Ioduro de Propidio (A, D, G, J, M y O), en la segunda fila los receptores TRPV1 marcados con FITC (B, E, H, K, N y P) y la tercera fila la co-localización (C, F, I, L, Ñ y Q). Las columnas indican las fotografías de las células TRPV1⁺ tomadas de los cortes obtenidos de los cerebros de las ratas; intacta (A, B y C), intacta + entrenamiento (D, E y F), sham (G, H, I), sham + entrenamiento (J, K y L), ocluida (M, N y Ñ), ocluida + entrenamiento (O, P y Q). En B se observa la gráfica de las medianas del número de células TRPV1⁺/campo en CA1 del hipocampo de ratas (n=1). La ANOVA de Friedman reveló que no existe diferencia significativa entre los grupos, $p > 0.05$. Escala 10 μ m.

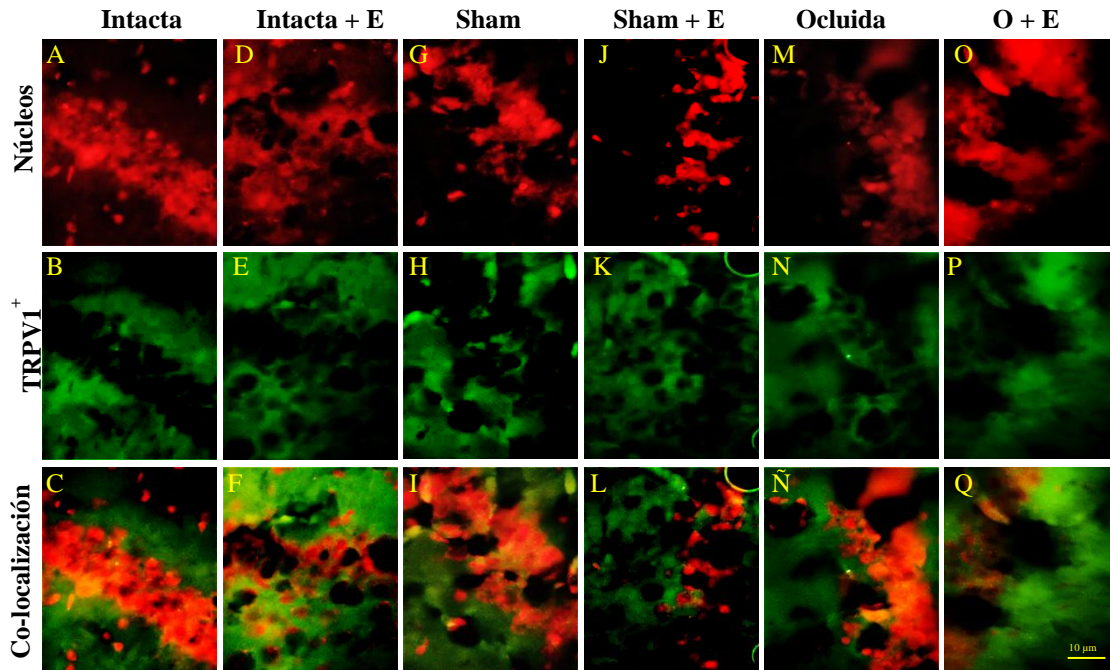


Figura 19. Se muestran imágenes de la inmunohistoquímica de los receptores TRPV1 en el CA1 del hipocampo a 40x. En la primera fila los núcleos neuronales en rojo marcados con Ioduro de Propidio (A, D, G, J, M y O), segunda fila los receptores TRPV1 marcados con FITC (B, E, H, K, N y P) y en la tercera fila la co-localización (C, F, I, L, Ñ y Q). En las columnas se indican las fotografías de las células TRPV1⁺ tomadas de los cortes obtenidos de los cerebros de las ratas; intacta (A, B y C), intacta + entrenamiento (D, E y F), sham (G, H, I), sham + entrenamiento (J, K y L), ocluida (M, N y Ñ), ocluida + entrenamiento (O, P y Q). Escala 10 µm.

VII.6 Cambios morfológicos en las neuronas piramidales

Las mediciones se realizaron en el *stratum radiatum* (s. r.), de la región de CA1.

Longitud dendrítica

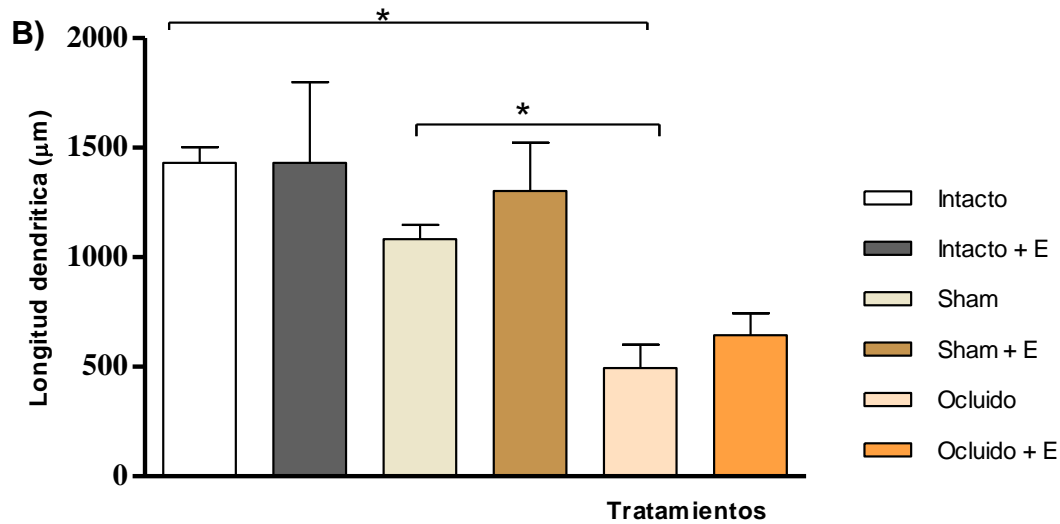
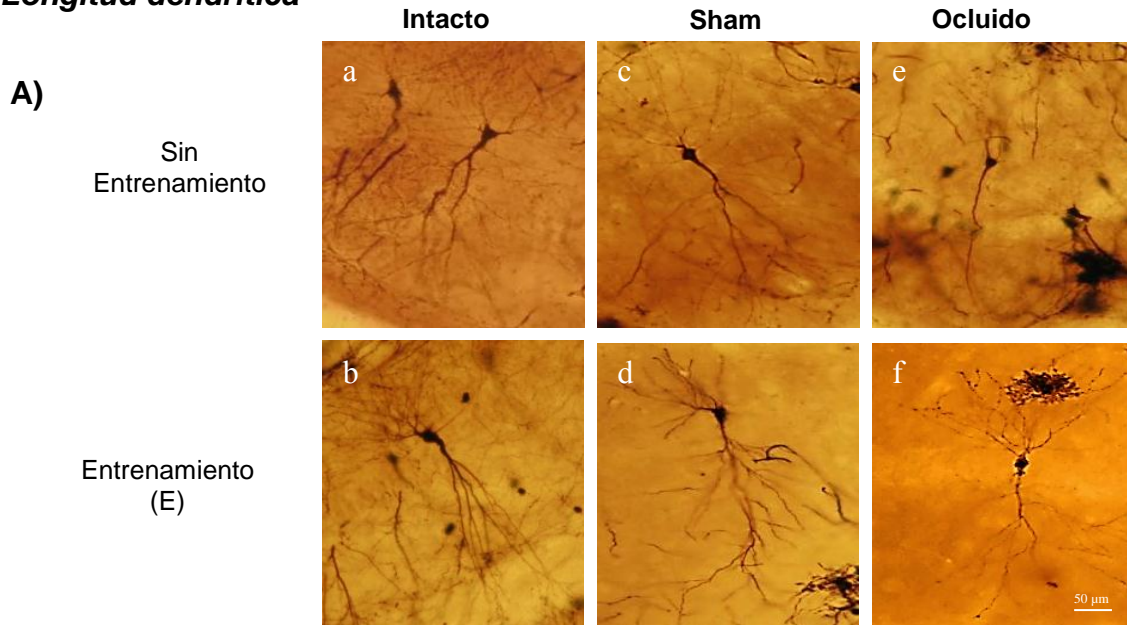


Figura 20. Longitud dendrítica de neuronas piramidales de CA1 en *stratum radiatum* (s.r.). A) Fotografías de neuronas piramidales de los grupos: a) intacto, b) intacto + entrenamiento, c) sham, d) sham + entrenamiento, e) ocluido, f) ocluido + entrenamiento. B) Se muestra la gráfica que indica que hay diferencia significativa entre las medias de la longitud dendrítica del grupo intacto con el grupo ocluido, así como entre las medias de la longitud dendrítica del grupo sham comparado con el grupo de ratas con oclusión. ANOVA de dos vías post-hoc Tukey * $p < 0.05$. E; entrenamiento. Escala 50 µm.

Número de dendritas

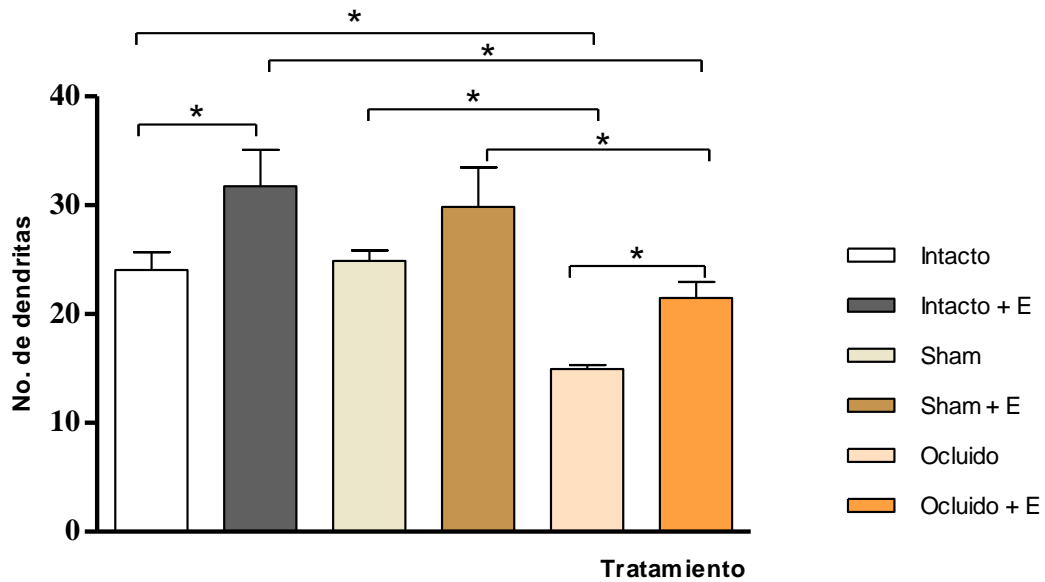


Figura 21. Número de dendritas de neuronas piramidales del CA1 en *stratum radiatum* (*s.r.*). La gráfica indica que hay diferencia significativa entre las medias del número de dendritas entre el grupo intacto con el grupo ocluido; el grupo sham con el grupo ocluido; el grupo intacto con el grupo intacto + entrenamiento; grupo intacto + entrenamiento con el grupo ocluido + entrenamiento; grupo ocluido con el grupo ocluido + entrenamiento; grupo sham + entrenamiento con grupo ocluido + entrenamiento. La ANOVA de dos vías post-hoc Tukey $*p < 0.05$. E; entrenamiento. Escala 50 μm .

Numero de espinas dendríticas

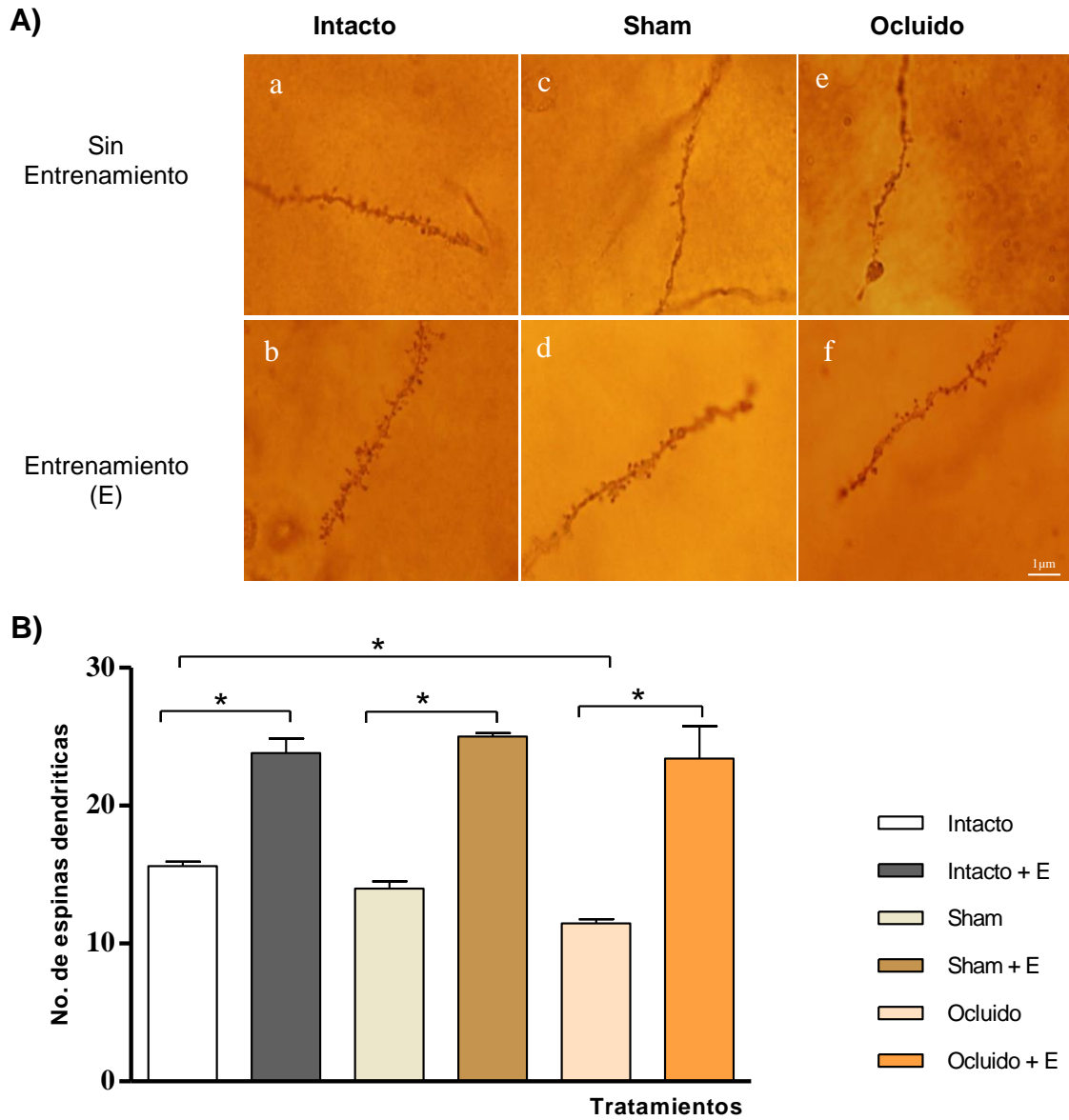


Figura 22. Número de espinas dendríticas por cada segmento de 10 μm de neuronas piramidales de CA1 en *stratum radiatum* (s.r.). (A) Fotografías de espinas dendríticas de los grupos: a) intacto, b) intacto + entrenamiento, c) sham, d) sham + entrenamiento, e) ocluido, f) ocluido + entrenamiento. B) La gráfica indica que hay diferencia significativa entre las medias del número de espinas dendríticas entre el grupo intacto con el grupo ocluido; grupo intacto con grupo intacto + entrenamiento; grupo sham con el grupo sham + entrenamiento; grupo ocluido y el grupo ocluido + entrenamiento. ANOVA de dos vías post-hoc Tukey $*p < 0.05$. E; entrenamiento. Escala 50 μm .

VII.6 Cambios morfológicos en las neuronas piramidales representado en porcentaje

El valor de la longitud dendrítica, número de dendritas y número de espinas del grupo control se consideró como el 100 %, el porcentaje se obtuvo mediante la

siguiente ecuación: $1 - \left(\frac{a-b}{a+b}\right) \times 100$

Dónde:

a: es el valor de la longitud obtenida por el grupo control

b: es el valor de la longitud dendrítica de los diferentes grupos.

Longitud dendrítica expresada en porcentaje

Grupo	Promedio (Longitud dendrítica μm)	%
Intacto	1431.5	100
Intacto + E	1430.4	99.9
Sham	1083	75.7
Sham + E	1301.8	90.9
Ocluido	494.76	34.6
Ocluido + E	644.55	45.0

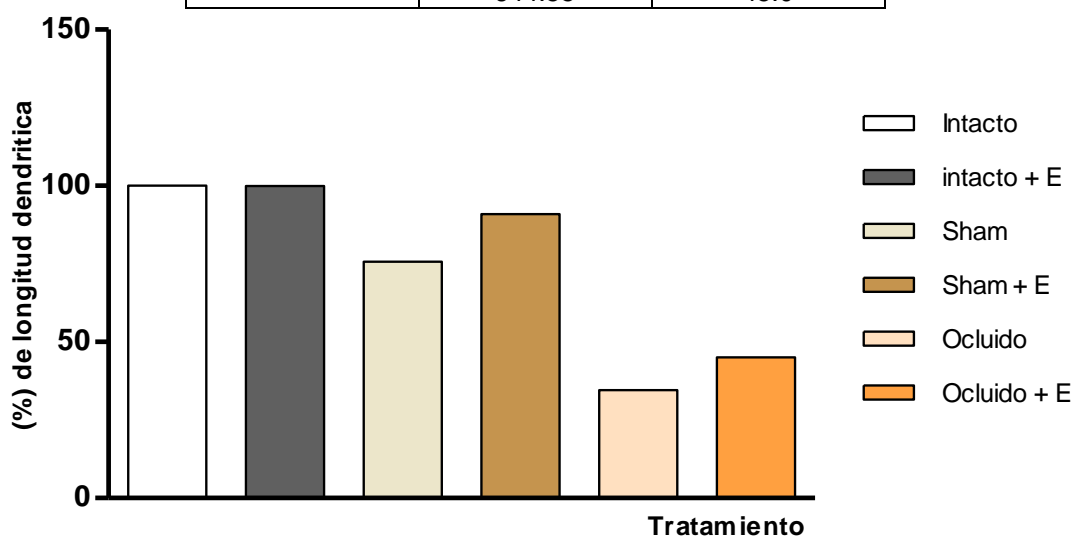


Figura 23. Longitud dendrítica expresada en porcentaje de neuronas piramidales de CA1 en el *stratum radiatum* (s.r.), de los grupos intacto, intacto + E, sham, sham + E, ocluido, ocluido + E.

Número de dendritas expresado en porcentaje

Grupo	Promedio (N. de dendritas)	%
Intacto	24.05	100
Intacto + E	31.75	132.0
Sham	24.88	103.5
Sham + E	29.83	124.0
Ocluido	14.95	62.2
Ocluido + E	21.46	89.2

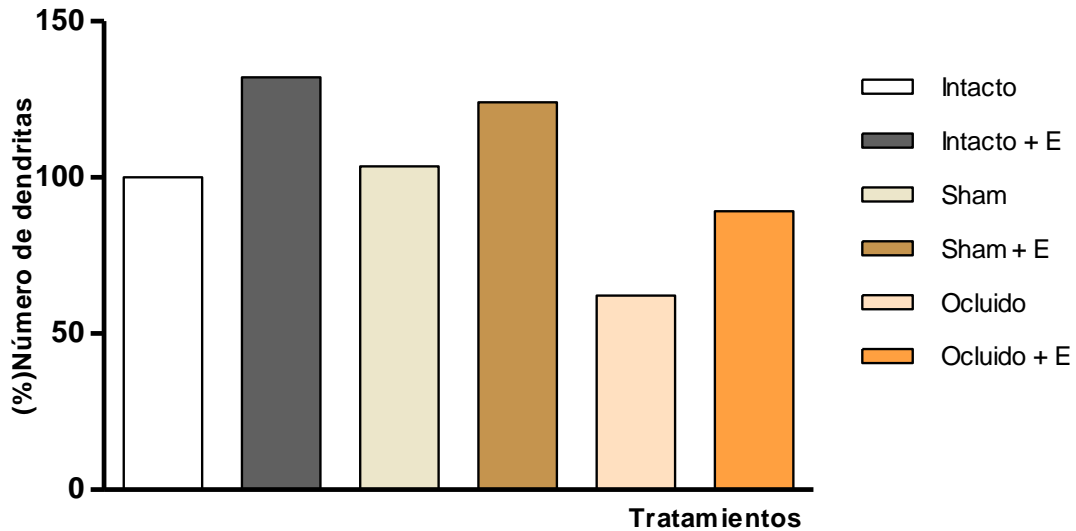


Figura 24. Número de dendritas expresado en porcentaje de neuronas piramidales del CA1 en el *stratum radiatum* (s.r.) de los grupos: intacto, intacto + E, sham, sham + E, ocluido, ocluido + E.

Número de espinas dendríticas expresado en porcentaje

Grupo	Promedio (N. de espinas/ 10 μ m)	%
Intacto	15.6	100
Intacto + E	23.8	152.6
Sham	13.98	89.6
Sham + E	25	160.3
Ocluido	11.46	73.5
Ocluido + E	23.41	150.1

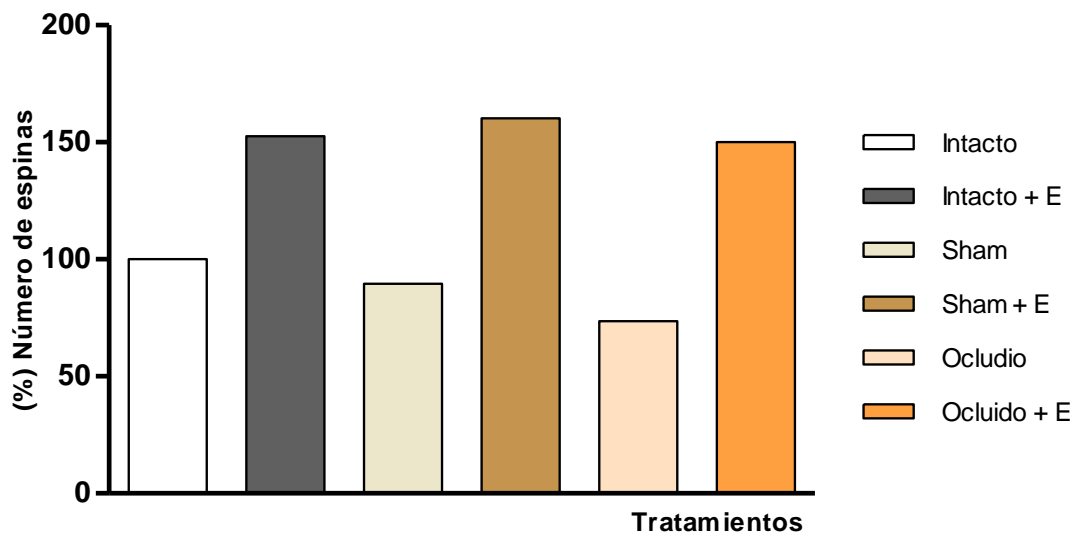


Figura 25. Número de espinas dendríticas expresado en porcentaje de neuronas piramidales del CA1 en el *stratum radiatum* (s.r.) de los grupos: intacto, intacto + E, sham, sham + E, ocluido, ocluido + E.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En animales, los modelos de isquemia cerebral focal permiten reproducir los fenómenos que se desencadenan después de la oclusión de una arteria cerebral que provoca una deficiencia de aporte de oxígeno y de glucosa, las únicas fuentes de energía para el cerebro, como consecuencia generan daños cognitivos y motores (Prieto y cols., 2008).

En la presente tesis se empleó la técnica de oclusión de la arteria carótida común izquierda. Los sujetos sometidos a la oclusión presentaron ptosis palpebral en el ojo izquierdo y postura encorvada, efectos que son considerados señales inequívocas de que la isquemia cerebral fue inducida (Candelario-Jalil y cols., 2003).

Por otro lado, la tinción con el 2, 3, 5- cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), permitió evaluar el efecto de la oclusión sobre el tejido nervioso; en la figura 13 A y B (pág., 31), se muestran los resultados obtenidos con esta técnica; las zonas incoloras indican que la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales esta reducida o ausente, lo que impide que el TTC sea reducido a rojo de formazan resultados similares han sido reportados por otros autores (Benedek y cols., 2006; Barth y Mody en 2011). Además de estas evidencias, se realizó la tinción de Nissl con el objetivo de determinar los cambios en la población neuronal de CA1 del hipocampo después de una oclusión ya que es una técnica que proporciona una panorámica general de la distribución, tamaño y morfología de las neuronas. En la figura 14, (pág., 32) se muestran los resultados obtenidos, como se puede observar existe la disminución de la población neuronal en el CA1 (fotografía F), respecto a las fotografías B y D. Si bien no se realizó una determinación cuantitativa, la tinción nos permite valorar el efecto de la oclusión. Se podría proponer que la pérdida de neuronas no fue mayor debido al empleo de ketoprofeno durante el periodo post-operatorio (4 dosis); existen evidencias experimentales que sugieren que el empleo de antiinflamatorios como parecoxib y rofecoxib que son inhibidores selectivos de la COX-2 y el valeril salicilato que es un inhibidor selectivo de la COX-1 protegen a las neuronas de los efectos de la

isquemia por la disminución de la síntesis de precursores inflamatorios como la prostaglandina E2, la cual contribuye a la respuesta inflamatoria después de la isquemia cerebral mediante la infiltración de leucocitos y a la formación de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la muerte neuronal (Candelario-Jalil y cols.2003; Xia y cols., 2007; Na y cols., 2011).

El uso de antiinflamatorios en los modelos de lesión cerebral es ampliamente controvertido ya que se ha reportado que algunos AINES interfieren con el daño neuronal cuando la administración es crónica, la administración de Ibuprofeno en un tiempo mayor a 4 meses contribuye a la muerte neuronal en un modelo de lesión traumática en ratas induciendo un deterioro en la función cognitiva cuando es evaluada en el laberinto acuático de Morris (Rowe y cols., 2013).

En la prueba del laberinto de Barnes los tiempos de latencia de escape obtenidos por los grupos intacto, sham y ocluido es similar, no hay diferencia estadística significativa entre ellos, lo que indica que la isquemia no incapacita a los animales para adquirir y recuperar información de tipo espacial, resultados semejantes fueron reportados por Matsumori y colaboradores (2006); quienes no encontraron diferencias en la ejecución de la tarea en el laberinto de acuático de Morris entre los animales sham y los sujetos con isquemia. Es posible proponer que esta habilidad espacial sea resultado del aumento del número de dendritas y de espinas dendríticas, Beltrán-Campos y colaboradores (2011), reportan resultados semejantes al emplear el laberinto acuático de Morris.

Existen evidencias que contradicen estos resultados como los reportados por Li y colaboradores en 2013; los autores encuentran que la oclusión de arteria cerebral media izquierda por una hora provoca deficiencia en el rendimiento espacial cuando es evaluado en el laberinto acuático de Morris 30 días después de la isquemia. Xia y cols., 2007, tampoco encuentran mejora en la ejecución de ratones isquémicos en la misma tarea.

El número de errores es un parámetro que se relaciona directamente con la latencia de escape. En el laberinto de Barnes se considera que el animal ha aprendido a localizar la caja de escape cuando comete menos de tres errores por ensayo (Navarrete y cols., 2008), en la figura 15 A y B (pág., 33), se muestran los resultados obtenidos, aunque las pruebas estadísticas indican que no hay diferencia significativa entre los grupos, estos resultados también son presentados en porcentaje de aprendizaje (figura 16, pág., 34), después del ensayo 7 los tiempos de latencia fluctúan de forma similar entre los 3 grupos y estos tiempos se relacionan con el número de errores cometidos antes de localizar la caja de escape; si el tiempo de latencia es alto, el número de errores es alto y si el tiempo de latencia es bajo, el número de errores es menor, como se observa en la figura 17 A y B (pág., 35). Es importante resaltar que hubo excepciones donde los tiempos de latencia fueron altos pero el número de errores bajo en este caso la rata empleó parte del tiempo asignado para explorar a su alrededor lo que implicaría que la isquemia no disminuyó esta capacidad en el roedor.

En todos los grupos propuestos en este trabajo se encontró que el receptor TRPV1 está expresado; en el corte proveniente de un animal del grupo intacto, el del grupo intacto con entrenamiento, en el del grupo sham, y en el del grupo sham con entrenamiento, el del grupo ocluido y el del grupo ocluido con entrenamiento como se muestra en la figura 18 y 19 (pág., 36-37), sin haber diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Sin embargo se puede observar que en los grupos intacto y sham sin entrenamiento el TRPV1 se encuentra expresado en menor cantidad que en todos los grupos con entrenamiento y el grupo ocluido sin entrenamiento, en los grupos con entrenamiento el incremento de la expresión del receptor TRPV1 podría estar relacionado con la activación del receptor TrkB por la unión del BDNF, al autofosforilarse el TrkB se activan dos vías: la vía de la fosfolipasa C y la de la PI3K, ambas conducen a la activación de proteína Src que fosforila al receptor TRPV1 y lo moviliza hacia la membrana incrementando así su expresión como se muestra en el esquema 26 (pág., 49) (Lin y cols., 2011); existe un correlato funcional entre estos resultados y los obtenidos en el número de dendritas y espinas dendríticas como se observa en las figuras 21 y 22; (pág., 39 y

40). Una posible explicación a estos hallazgos es que el TRPV1 está presente en los conos de crecimiento de las dendritas y en las espinas dendríticas en donde participa en los procesos de reorganización del citoesqueleto de actina y que su activación por el ligando endógeno N-araquidonoil dopamina (NADA) contribuye a la elongación y al mantenimiento de la forma de las espinas dendríticas (Goswami, 2010). Por otro lado, se ha visto que durante la isquemia cerebral se activa la microglía la cual libera al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que favorece la disminución de la lesión isquémica y promueve la actividad fagocítica (Jiang y cols., 2010), además, durante el aprendizaje hay una sobreexpresión del mRNA del BDNF el cual juega un papel importante en la potenciación a largo plazo (LTP) una forma de plasticidad sináptica que se cree es la base de la formación de la memoria a largo plazo al inducir la expresión de genes en la población neuronal del hipocampo como la proteína Arc, producto de un gen de respuesta inmediata encargado de la regulación dinámica del citoesqueleto de actina que subyace a la LTP (Pisu y cols., 2011) mecanismo que contribuye al aumento de las espinas dendríticas y número de dendritas (Bekinschtein, y cols., 2011).

Por medio de la tinción de Golgi-Cox se evaluó la morfología de neuronas piramidales; respecto a la longitud dendrítica no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos como se muestra en la figura 20, (pág., 38), no obstante se puede observar que en los grupos que fueron entrenados en el laberinto de Barnes se observa mayor longitud dendrítica en comparación con los grupos que no fueron entrenados. Por otro lado, el número de dendritas es mayor en el grupo intacto entrenado en la tarea espacial, en el grupo sham con aprendizaje y en el grupo de ratas ocluidas con aprendizaje respecto a los grupos que no fueron sometidos a aprendizaje espacial, lo que permite sugerir que el aprendizaje espacial favorece el aumento del número de dendríticas en las células piramidales del CA1, el mismo fenómeno ocurre con el número de espinas dendríticas. Una posible explicación al aumento del número de dendritas y de espinas dendríticas podría ser la liberación de factores neurotróficos tras la isquemia cerebral (Sobrado y cols., 2007), la morfología de las neuronas

piramidales de CA1 fue analizada exclusivamente en el *stratum radiatum* por ser la zona que más cambios morfológicos presenta ante la experiencia espacial como lo reportan otros autores (Eckert y cols., 2010; Beltrán-Campos y cols., 2011), además de ser la zona que sufre cambios importantes durante la isquemia cerebral (Kovalenko y cols., 2006).

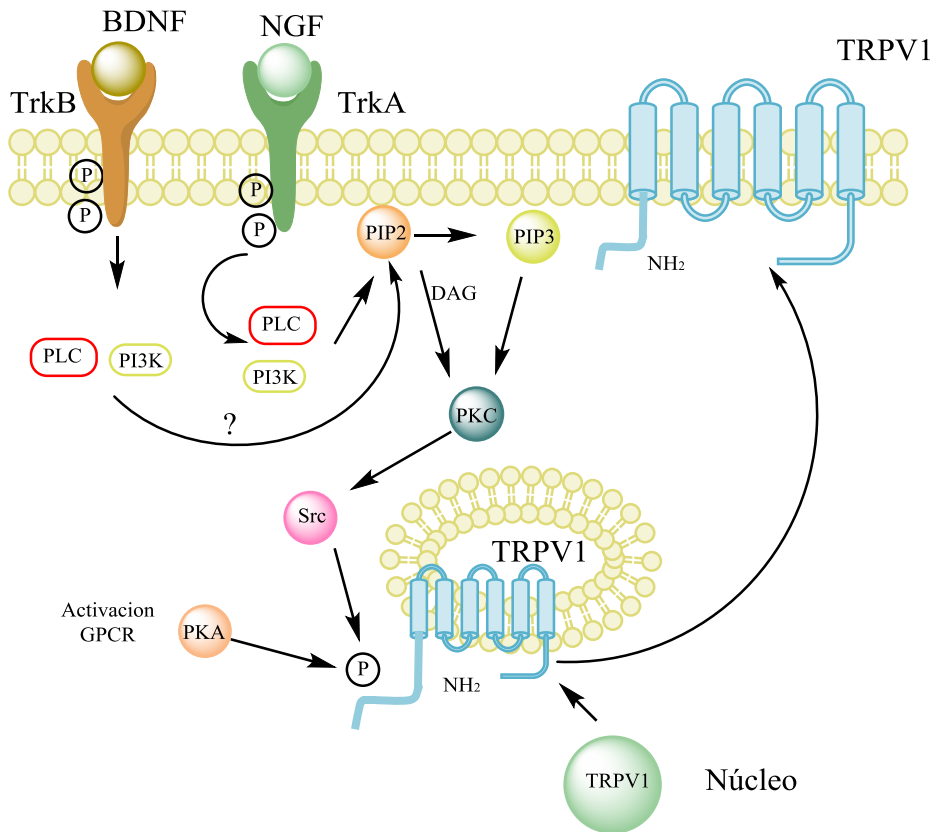


Figura 26. Esquema hipotético de la expresión del receptor TRPV1 regulada por BDNF. Cuando incrementan los niveles de BDNF a causa de la isquemia cerebral o el aprendizaje, este se une al receptor TrkB que al ser activado se va autofosforilar y a su vez activar dos vías PLC y PI3K (Lin y cols., 2011) lo que conduce a la activación de PKC y la síntesis de PIP3 que también estimula a PKC. Al estar activada la PKC activa a su vez a la proteína Src la que va a fosforilar al receptor TRPV1 en su extremo N-terminal en el residuo de tirosina Y200, una vez fosforilado se inserta en la membrana celular (Pingle y cols., 2007; Stein y cols., 2006). PLC: fosfolipasa C, PI3K; fosfatidilinositol-3-kinasa, PIP2; fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PIP3; fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato, DAG; diacilglicerol, PKC: proteína quinasa C, PKA; proteína quinasa B.

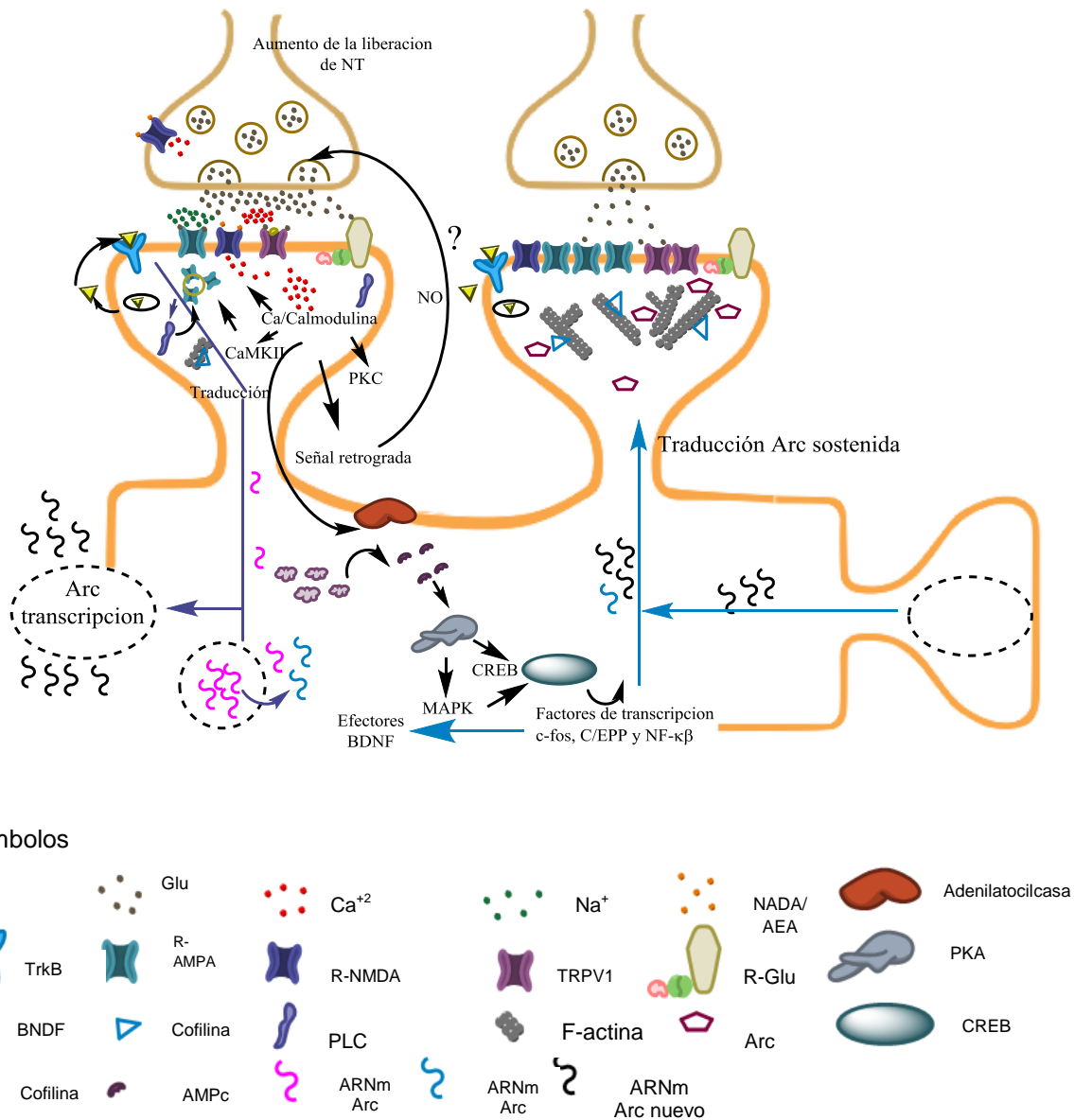


Figura 27. Esquema hipotético de la potenciación a largo plazo temprana y tardía que implica la participación del receptor TRPV1 y el BDNF. Al ser estimulada la terminal presináptica hay un incremento de la concentración del Ca²⁺ intracelular, este incremento va a movilizar a las vesículas que contienen al neurotransmisor glutamato que al ser vertido a la sinapsis se une a los receptores AMPA, NMDA y receptor de glutamato metabotrópico en la postsinapsis. Al ser activado el receptor AMPA va a entrar Na⁺ y va a despolarizar a la neurona postsináptica, esta despolarización va a liberar al receptor NMDA del ion Mg²⁺ que lo mantenía bloqueado y va a permitir la entrada de calcio, al aumentar el calcio intracelular en la neurona postsináptica se forma el complejo Ca²⁺/calmodulina, este complejo fosforila a los receptores AMPA que se encuentran en el

retículo endoplásmico y los moviliza hacia la membrana por otro lado activa a la CaMKII, que también fosforila y moviliza a los receptores AMPA hacia la membrana. Después de la activación del receptor de glutamato metabotrópico se va a activar la fosfolipasa C y va a promover la síntesis de IP3 que va a contribuir al aumento del Ca^{+2} , el DAG va a activar a la PKC que junto con CaMKII van a activar una señal retrograda que va a conducir a la liberación de NO el cual contribuye al aumento en la liberación de neurotransmisor glutamato en la terminal presináptica. El complejo formado por Ca^{+2} /Calmodulina estimula a la adenilato ciclasa y promueve la síntesis de AMPc a partir de ATP, a su vez el AMPc activa a la PKA y MAPK que van a fosforilar a CREB en ApCREB1 y ApCREB2 respectivamente, CREB fosforilado va a inducir la expresión de genes de factores de transcripción como c-fos, C/EPP y NF- $\kappa\beta$ (Barco y cols., 2006) y del BDNF que es liberado de la terminal post-sináptica y al unirse a TrkB favorece su autofosforilación y activa a la PLC y va a contribuir al aumento de Ca^{+2} y la activación de CaMKII y también fosforilar a los receptores AMPA para aumentar su inserción a la membrana. CaMKII activada desestabiliza los filamentos de actina que son reorganizados y elongados por la Arc que ha sido movilizada desde la dendrita hasta la espina dendrítica. El mecanismo propuesto para incrementar el tamaño de la cabeza de la espina es la fosforilación de la cofilina por Arc (Bramham, 2008). Durante la inducción de la potenciación a largo plazo se propone que la activación del receptor TRPV1 por ligandos endógenos Anandamida, N-araquidonoil dopamina (NADA) en la terminal presináptica va a contribuir a aumentar la concentración del calcio y así favorecer la liberación del neurotransmisor, en la postsinapsis también permite la entrada de calcio y favorece la activación de enzimas dependientes de Ca^{+2} (Ho y cols., 2012). Glu; glutamato, NADA; N-araquidonoil dopamina, AEA; anandamida, PKA; proteína kinasa A, BDNF; factor neurotrófico derivado del cerebro, PLC; fosfolipasa C, ATP; adenosin trifosfato, AMPc; adenosin monofosfato cíclico.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que la oclusión de la arteria carótida común izquierda durante 60 minutos no provoca deficiencias motoras en ratas hembras de la cepa Wistar, la isquemia cerebral no impide que los animales adquieran información espacial, éste aprendizaje produjo un incremento el número de dendritas y el número de espinas dendríticas en *stratum radiatum* de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, estos cambios morfológicos no se relacionan con la expresión del receptor TRPV1 en dichas células.

X. REFERENCIAS

- Alkayed, N., J., Murphy, S., J., Traystman R., J., Hurn, P., D. (2000). Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke*, 31(1),161-168.
- Alvarado, M. J. R. (2005). A 120 años del método de Golgi. Centro de Microscopia Electrónica. *Revista de la Facultad de Medicina*, Universidad de los Andes, 2, 3-4.
- Amaral, D. y Lavenex, P. (2007). *Hippocampal Neuroanatomy*. En: Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'Keefe, J. (Ed). *The hippocampus book*. Nueva York: Oxford University Press, pp. 37-114.
- Arango-Dávila, C. A., Escobar, M. I., Buriticá, E. y Pimienta, H. (2008). Cambios exofocales en la isquemia cerebral focal experimental: una visión experimental y su correlato clínico. *Colombia Médica*, 39 (3), 85-94.
- Balderas, I., Ramírez-Amaya, V. y Bermudez-Rattoni, F. (2004). Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Revista de Neurología*, 38 (10), 944-948.
- Barco, A., Bailey, C., H. y Kandel E., R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of Neurochemistry*, 97 (6), 1520–1533.
- Barth, A. M. I. y Mody, I. (2011). Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 31 (3), 851-860.
- Bekinschtein, P., Oomen, C., A., Saksida, Lisa, M. y Bussey, Timothy, J. (2011). Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22 (1) 536–542.

- Beltrán-Campos, V., Prado-Alcalá, R.A., León-Jacinto, U., Aguilar-Vázquez, A., Quirarte, G.L., Ramírez-Amaya, V. y Díaz-Cintra, S. (2011). Increase of mushroom spine density in CA1 apical dendrites produced by water maze training is prevented by ovariectomy. *Brain Research*, 1369, 119-130.
- Benedek, A., Moricz, K., Jurányi, Z., Gigler, G., Lévy, G., Harsing Jr, L. G., Mátyus, P., Szenasi, G. y Albert, M. (2006). Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after local cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 1116, 159-165.
- Bennion, D., Jensen, T., Walther, C., Hamblin, J., Wallmann, A., Couch, J., Blickenstaff, J., Castle, M., Dean, L., Beckstead, S., Merrill, C., Muir, C., St. Pierre., Williams, B., Daniel, S. y Edwards, J G. (2011). Transient receptor potential vanilloid 1 agonists modulate hippocampal CA1 LTP via the GABAergic system. *Neuropharmacology*, 61 (4), 730-738.
- Bramham, C., R. (2008). Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Current opinion in Neurobiology*, 8:524–531.
- Candelario-Jalil, E., González-Falcón, A., García-Cabrera, M., Álvarez, D., Al-Dalain, S., Martínez, G., León, O. S. y Springer J. E. (2003). Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 86 (3), 545-555.
- Carrillo-Mora, P., Giordano, M. y Santamaria, A. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203, 151-164.
- Chu, C., Zavala, K., Fahimi, A., Lee, J., Xue, Q., Eilers, H. y Schumacher, M. A. (2011). Transcription factors Sp1 and Sp4 regulate TRPV1 gene expression in rat sensory neurons. *Molecular pain*, 7, (44), 1-14.

- Cristino, L., Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., y Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139, 1405-1415.
- Eckert, M. J., Bilkey, D. K. y Abrahamli, W. C. (2010). Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. *Journal of Neurophysiology*, 103, 3320-3329.
- Geibprasert, S., Galluci, M. y Krings, T. (2010). Addictive Illegal Drugs: Structural Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, 31 (1), 803– 08
- Goswami, C. (2010). Structural and functional regulation of growth cone, filopodia and synaptic sites by TRPV1. *Communicative & Integrative Biology*, 3 (6), 614-618
- Han, P., Korepanova, A. V., Vos, M. H., Moreland, R. B., Chiu, M. L. y Fatynek, C. R. (2012). Quantification of TRPV1 protein levels in rat tissues to understand its physiological roles. *Neuroscience*, 50 (1), 23-32.
- Harrison, F. E., Hosseini, H. A. y McDonald, M. P. (2008). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavior Brain Research*, 198 (1), 247-251.
- Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J. y McDonald, M. P. (2006). Spatial and non-spatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, 13, 809-819.
- Ho, K., W., Ward, N., J. y Calkins, D., J. (2012). TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 1(1): 1–14.
- Inagaki, T., Kaneko, N., Zukin, R., S., Castillo, P, E. y Etgen, A. M. (2012). Estradiol attenuates ischemia induced death of hippocampal neurons and

enhances synaptic transmission in aged, long-term hormone deprived female rats. *Public Library of Science One*, 7(6), 1-9.

Isayama, K., Pitts, L., H. y Nishimura, M., C. (1991). Evaluation of 2, 3, 5 – Triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke*, 22 (1),1394-1398.

Jiang, Y., Wei, N., Zhu, J., Lu, T., Chen, Z., Xu, G. y Liu, X. (2010). Effects of brain-derived neurotrophic factor on local inflammation in experimental stroke of rat. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-10.

Kádár, A.,Wittmann, G., Liposits, Z. y Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of Neuroscience Methods*, 184 (1), 115-118.

Kauer, J. A. y Gibson, H. E. (2009). Hot Flash: TRPV channels in the brain. *Trends in Neuroscience*, 32 (4), 215-224.

Khatibi, N. H., Jadhav, V., Charles, S., Chiu, J., Buchholz, J. Tang, J. y Zhang, J. H. (2011). Capsaicin pre-treatment provides neurovascular protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Intracerebral Hemorrhage Research*, 111, 225-230.

Kovalenko, T., Osadchenko I., Nikonenko, A., Lushnikova, I., Voronin, Nikonenko, I., Muller, D. y Skibo G. (2006). Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 *stratum radiatum* excitatory synapses. *Hippocampus*, 16 (10), 814-825.

Koyama, Y. y Tohyama, Y. (2012). A modified and highly sensitive Golgi–Cox method to enable complete and stable impregnation of embryonic neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 209, 58-61.

- Li, H. B., Mao, R. R., Zhang, J. C., Yang, Y., Cao, J., Xu, L. (2008). Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biological Psychiatry*, 64, 286-292.
- Li, W., Huang R., Shetty, R. A., Thangthaeng, N., Liu, R., Chen, Z., Sumien, N., Rutledge, M., Dillon, G. H., Fang, Y., Forster, M. J., Simpkins, J. W. y Yang, S. H. (2013). Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. *Neurobiology of Disease*, 59, 18-25.
- Lin, Y.-T. Ro, L.-S., Wang, H.-L. y Chen J.-C. (2011). Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study. *Journal of Neuroinflammation*, 8(126), 1-22.
- Liu, F. y McCullough, Louise, D. (2011). Middle cerebral artery occlusion model in rodents: Methods and potential pitfalls. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011, 1-9.
- Liu, F., Schafer, D. P. y McCullough, L. D. (2008). TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 179, 1-8.
- Lübbert, M., Kyereme, J., Schöbel, N., Beltran, L., Horst, W., C. y Hatt, H. (2013). Transient receptor potential channels encode volatile chemicals sensed by rat trigeminal ganglion neurons. *Public Library of Science One*, 8 (10), 1-17.
- Lynch, M., A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews*, 84 (1), 87-136.
- Matsumori, Y., Hong, S. M., Fan, Y., Kayama, T., Hsu, C. Y., Weinstein, P. R., y Liu, J. (2006). Enriched environment and spatial learning enhance hippocampal neurogenesis and salvages ischemic penumbra after focal cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*, 22, 187-198.

- Mezey, E., Tóth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P. M. y Szallasi, A. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1) and VR1-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (7), 3655-3660.
- Mrozek, S., Vardon, F. y Geeraerts, T. (2012). Brain Temperature: Physiology and pathophysiology after brain injury. *Anesthesiology Research and Practice*, 2012, 1-13.
- Na, W., Qu-lian G., Zhi, Y, Ping-ping, X., Wang, E. y Ya-jing, Y. (2011). Preconditioning of intravenous Parecoxib attenuates focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Chinese Medical Journal*, 124 (13), 2004-2008.
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J. M., Femenía, T., García-Gutiérrez, M.S., García-Payá, M.E., Leiva-Santana, C. y Manzanares, J. (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Revista de Neurología* 47 (3): 137-145.
- Ouh, I-O., Kim, Y-M., Gim, S-A y Koh, P-O. (2013). Focal cerebral ischemic injury decreases calbindin expression in brain tissue and HT22 cells. *Laboratory Animal Research*, 29 (3), 156-161.
- Pegorini, S., Braidá, D., Verzoni, C., Guerini-Rocco, C., Giacomo-Consalez, G., Croci, L. y Sala, M. (2005). Capsaicin exhibits neuroprotective effects in a model of transient global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *British Journal of Pharmacology*, 144, 727-735.
- Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Cerebrovasculares en México. (2010). Secretaría de salud. Dirección general de epidemiología. México, pp. 40-42.

- Pingle, S.C., Matta, J. A. y Ahern G. P. (2007) Capsaicin Receptor: TRPV1 A Promiscuous TRP Channel. En: Flockerzi, V. y Nilius B. (Ed). *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, 179, 155-171.
- Pisu, M. G., Dore, R, Mostallino, M. C., Loi, M., Pibiri, F., Mameli, R., Cadeddu, R., Secci, P. P. y Serra, M. (2011). Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behavioural Brain Research*, 222, 73-80.
- Prieto, A. R., Moreno, G. A. Hernández, S. P., Pascual, G. J. M., Matías, G. J., Roda, J.M. y Barcia-Albacar, J.A., 2008. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Revista de Neurología*, 47, 414-26.
- Ranjan, A. y Mallick, N. B. (2010). A modified method for consistent and reliable Golgi–Cox staining in significantly reduced time. *Frontiers in Neurology*, 1 (157), 1-8.
- Regueiro, R. J., López L. C., (2002). Evaluación de la inmunidad. En: *inmunología: biología y patología del sistema inmune*, pp. 195-202. Madrid España, medica panamericana.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *The Royal Society Biological Sciences*, 361, 1545-1564.
- Rowe, R., K., Harrison, J., L., Thomas, T., C., Pauly, J., R., Adelson, P., D. y Lifshitz, J. (2013). Using anesthetics and analgesics in experimental traumatic brain injury. *LabAnimal*, 42 (8), 286-291.
- Ruan, Y. W., Zou, B., Fan, Y., Li, Y., Lin, N., Zeng, Y. S., Gao, T. M., Yao, Z. y Xu, Z. C. (2006). Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*, 140, 191-201.
- Salazar, H., Oseguera, A. J. y Rosenbaum, T. (2009). El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Revista de Neurología*, 48 (7), 357-364.

- Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario oficial de la federación de México. Estados Unidos Mexicanos.
- Sobrado, M. S., Moro, M. Á. y Urtado, O. H. (2007). El papel de la glía en la isquemia cerebral. En: Montaner J. (Ed) *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Universidad Complutense de Madrid. pp. 145-158.
- Spruston, N. y McBain, C. (2007). Structural and functional properties of hippocampal neurons. En: Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'Keefe, J. (Ed). *The hippocampus book*. Nueva York. Oxford University Press. pp. 133-201.
- Starowicz, K., Cristino, L. y Di Marzo, V. (2008). TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Current pharmaceutical Design*, 14, 42-54.
- Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C. A., Hua, L., Santana, L. F. y Gordon, S. E. (2006). Phosphoinositide 3-Kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *The Journal of General Physiology*, 128 (5), 509-522.
- Taupin, P. (2007). The hippocampus. En: *Neurotransmission and plasticity in the nervous system*. New York. Nova Biomedical Books, pp. 3-12.
- Torres, F. O. (2006). La impregnación de la técnica argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de medicina (1906) compartido por camilo Golgi y Ramón y Cajal. *Biomédica*, 26, 498-508.
- Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Édes I., Csiba, L. y Blumberg, P. M. (2005). Expresión and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular Brain Research*, 35, 162-168.

- Vennekens, R., Owsianik, G. y Nilius, B. (2008). Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 18-31.
- Witter, M. P y Amaral, D. G. (2004). *Hippocampal formation*. En: Paxinos, G. (Ed.). *The rat nervous system* pp. 635-704, San Diego. Elsevier Academic Press.
- Xia L, C., Jiang, J., Gang-Zhou, Q., Jian-Zhu, X., Wang, W., Jun-Zhang, Z., Han, X. y Ya, Zhu D. (2007). Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus Is associated with spatial memory recovery from stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 1637-1646.
- Xiong, Z. G. y Xu, T. L. (2010). The role of ASICs in cerebral ischemia. *Wiley interdisciplinary reviews membrane transport and signaling*, 1 (5), 655-662.
- Yao, H. y Haddad, G. G. (2004). Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia. *Cell calcium*, 36, 247-255.
- Zambrano, V. S. (2007). *Reacción antígeno anticuerpo*. En: *Inmunología básica y clínica*, pp. 58-72. México D.F, Mc Graw Hill.
- Zhang, X., Huang, J. y McNaughton, P. A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 24, 4211-4223.