



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

**Caracterización de marcadores de hipoxia en el hipocampo en un modelo de
isquemia focal transitoria**

Tesis que presenta

Juan Eduardo Montero Hernández

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Dra. Claudia González Espinosa

Este trabajo se realizó en los laboratorios 09 y 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Sede Sur (CINESVTAV-Sede Sur) bajo la dirección de los doctores, Emilio Javier Galván Espinosa y Claudia González Espinosa. El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca de maestría 442692/337847 (CVU/Becario) y los proyectos CB-2011-01-166241 y INFR-2012-01-187757.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias por permitirme llegar hasta este punto.

A la Dra. María Elena Chánez Cárdenas, por sus valiosas observaciones en la realización de este trabajo y por todo su apoyo durante la maestría.

A la Dra. Janet Murbartián Aguilar, por su apoyo incondicional durante la etapa de la maestría, por sus excelentes sugerencias en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Perla Maldonado, por su grandísimo apoyo en la realización de este trabajo.

Al Mtro. Alfredo Ibarra Sánchez por su apoyo técnico de laboratorio. Por sus sabios consejos, por su gran amistad, lo quiero y admiro mucho.

A Juan J. López Guerrero por su apoyo técnico de laboratorio. Por su gran amistad.

A la Dra. Mónica Lamas Gregori por su apoyo y sugerencias al presente trabajo.

A la M. en C. Itzel Ramírez Moreno por su apoyo técnico de laboratorio y por su gran amistad.

Al Dr. José Alonso Fernández Guasti y a la Dra. Carolina López Rubalcava por su gran apoyo técnico en sus laboratorios.

A la Dra. Norma Leticia Gómez Víquez por su apoyo técnico de laboratorio, por su apoyo moral y su valiosa amistad.

A Blanca Nelly Gómez Quintana por su gran apoyo técnico de laboratorio y su valiosa amistad.

A la MBEI Ma. del Pilar Quinteros C. por su gran apoyo bibliográfico y por sus consejos.

Al M. en C. Iván Galván M., por su gran apoyo técnico en microscopia de fluorescencia.

A Gabo Herrera López por su apoyo técnico de laboratorio. Por su gran amistad, a pesar de que al principio nos conocíamos poco, me apoyó bastante y animó a entrar al programa de maestría, por darme asilo. Por todo le estoy agradecido infinitamente.

A mis compañeros de laboratorio que siempre hicieron amena la estancia y me apoyaron de alguna manera a concluir el presente trabajo: Meli, Itzeliní, Marbelliní, Faby, Zyan, Karlita, Jesa, Abra-jam, Rodo, Pablo.

Al Dr. Emilio J. Galván por su gran apoyo en la realización de este trabajo, por ser un gran tutor y compartir su conocimiento conmigo, por formarme en el área científica.

A la Dra. Claudia González Espinosa por su gran apoyo en la realización de la presente tesis, por su apoyo moral en las situaciones difíciles, por ser una gran tutora y por guiarme en el camino a la ciencia.

A mi familia: a mis padres, Gloria y Juan por siempre darme su amor y apoyo moral incondicionalmente, me siento muy orgulloso de ellos. A mi hermano Chris por ser un grandioso amigo, hermano y complica, por su gran apoyo. Los amo con el corazón.

A Leo (mi gateta), por ser un excelente amigo que siempre estuvo y está ahí en los buenos y malos momentos, por su gran apoyo incondicional. Por ser la gateta de la guardia y a quien siempre le estaré agradecido por todo, lo quiero y estimo muchísimo.

A mis amigos del CINVESTAV: César (mi mejor amigo), Brend (mi shidita), Candy (mi compa, mi hermanita), Ale (mi amore), Fany, Ursula, May, Erika (mi shiquitina), Caro y a Karmen (mi corazón bebé), quienes me apoyaron en el transcurso de la maestría y con quienes compartí experiencias inigualables. En especial a César por ser el mejor amigo desde el principio de la maestría y a mi gran amiga Candy por sonsacarme a tantos eventos dónde la pase genial.

A mis amigos Luis Garibay, Damaris, Héctor Tavira, Omar Murguía, Iris Reyes, Diana Pérez, Alexis Rojas, Lyn, Edgar Olivares, Dann, Maribel, Joel GaEl, More, Memo Arvizu, Obeth Espejel, Angelito Patiño, Hugo Fernández, Laura Tovar, Betza (mi cuñis), Oscar RaFo, Gaby Urbina, Francisco Olivares, Homero Cruz, Luis Cruz y al Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera por compartir parte de su tiempo conmigo y estar ahí cuándo los necesité. En especial a Luis Garibay y a mis *roomies* por ser un apoyo incondicional siempre, los quiero como si fueran mis hermanos de sangre.

ÍNDICE

Contenido	No. de Página
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	I
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La Enfermedad Vascular Cerebral	1
1.2. Daño cerebral isquémico.....	2
1.3. Modelos para el estudio de la isquemia cerebral	3
1.3.1. Modelo de oclusión de la arteria carótida común.....	4
1.4. Mecanismos celulares y moleculares en respuesta a la hipoxia	5
1.5. El VEGF como marcador de respuesta a la hipoxia.....	6
1.5.1. Efectos protectores del VEGF en la isquemia cerebral	8
1.6. La proteína PECAM-1 (CD31) como marcador de angiogénesis.....	8
1.7. El pimonidazol como herramienta para localizar zonas hipóxicas en los tejidos debido a la generación de estrés oxidativo.....	9
1.8. La caspasa 3 como indicador de daño isquémico.....	12
1.9. El hipocampo	14
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1. Daño isquémico en el hipocampo	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos específicos	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1. Animales	23
6.2. Modelo de isquemia focal transitoria	23
6.3. Marcaje de estrés oxidativo en tejido hipóxico	24

6.4.	Obtención del tejido cerebral.....	24
6.5.	Inmunofluorescencia	24
6.6.	Tinción de Hematoxilina-Eosina	26
6.7.	Análisis histológico.....	26
6.8.	Análisis estadístico.....	29
7.	RESULTADOS	30
7.1.	Cambios conformacionales en el hipocampo tras la CCAO.....	30
7.2.	Detección de hipoxia y daño oxidativo en el hipocampo	32
7.2.1.	Giro Dentado	32
7.2.2.	Región CA3	34
7.2.3.	Región CA1	36
7.3.	Efecto de la hipoxia en la expresión de VEGF y de CD31 en el hipocampo	37
7.3.1.	Giro Dentado	37
7.3.2.	Región CA3	39
7.3.3.	Región CA1	41
7.4.	Efecto de la isquemia sobre la activación de la Caspasa-3	43
7.4.1.	Giro Dentado	43
7.4.2.	Región CA3	44
7.4.3.	Región CA1	46
8.	DISCUSIÓN.....	48
8.1.	Cambios estructurales en el hipocampo generados por la isquemia	48
8.2.	Expresión de VEGF y CD31 después de un daño isquémico transitorio.....	49
8.3.	Oxidación de proteínas y cambios en la expresión de la caspasa-3 después de un daño isquémico transitorio en el hipocampo.	52
8.4.	Curso temporal de la expresión de marcadores de hipoxia y de daño isquémico en las distintas regiones del hipocampo	54
9.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	55
10.	CONCLUSIONES	56
11.	PERSPECTIVAS	57
12.	REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

NOMBRE DE FIGURA O TABLA	No. DE PÁGINA
Modelos experimentales de isquemia cerebral.	4
Papel de pVHL en la expresión de VEGF y angiogénesis.	6
Efectos autócrinos y parácrinos del VEGF en capilares.	7
Esquema de la activación reductiva del pimonidazol <i>in vivo</i> en condiciones de hipoxia.	11
Caspasa-3 y la apoptosis.	13
Microfotografía de un corte coronal de hipocampo de rata.	15
Daño isquémico al hipocampo.	18
Efecto de la CCAO sobre la transmisión sináptica de las sinapsis FM-CA3 y Sch-CA1.	19
Anticuerpos y sustancias.	25
ROI's seleccionados para las regiones del hipocampo.	27
ROI's seleccionados para los <i>sp</i> y <i>sg</i> en las regiones del hipocampo.	28
Tinción hematoxilina y eosina mostrando el curso temporal del desarreglo estructural del hipocampo tras el daño isquémico en cerebro.	30
Curso temporal del desarreglo estructural del hipocampo tras el daño isquémico en cerebro.	32
Curso temporal del estrés oxidante a las proteínas generado por la isquemia en GD.	33
Detección de hipoxia y estrés oxidativo en el GD.	34
Curso temporal del estrés oxidante a las proteínas generado por la isquemia en CA3.	35
Detección de hipoxia y estrés oxidativo en la región CA3.	35
Curso temporal del estrés oxidante a las proteínas generado por la isquemia en la región CA1.	36
Detección de hipoxia y estrés oxidativo en la región CA1 del hipocampo.	37
Expresión temporal de CD31 y VEGF como respuesta al daño isquémico en giro dentado.	38
La isquemia induce el aumento en la expresión de VEGF y CD31 en el GD.	39
Curso temporal de la expresión de CD31 y VEGF como respuesta al daño isquémico en la región CA3 del hipocampo.	40
La isquemia induce el aumento en la expresión de VEGF y CD31 en CA3.	40

Curso temporal de la expresión de CD31 y VEGF como respuesta al daño isquémico en la región CA1.	42
La isquemia induce el aumento en la expresión de VEGF y CD31 en la región CA1 del hipocampo.	42
Curso temporal de la expresión de caspasa 3 en el Giro dentado.	43
La isquemia incrementa la expresión de la caspasa-3 en el Giro Dentado.	44
Curso temporal de la expresión de caspasa 3 como marcador de apoptosis tras el daño isquémico en cerebro.	45
La isquemia incrementa la expresión de la caspasa 3 en CA3.	45
Curso temporal de la expresión de caspasa-3 en la región CA1.	46
La isquemia incrementa la expresión de la caspasa 3 en la región CA1 del hipocampo.	47

ABREVIATURAS

APAF1	Factor Apoptótico Activador de Proteasas 1
APAF-1	Factor Apoptótico Activador de Proteasas 1
BAK	Regulador de Apoptosis BAK
BAX	Regulador de Apoptosis BAX
BCL-2	Linfoma 2 de Células B
BCL-XL	Linfoma de Células B extra grande
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CA1	Cuerno de Amón 1 (Región CA1 del hipocampo)
CA3	Cuerno de Amón 3 (Región CA3 del hipocampo)
CARD	Dominio de Reclutamiento de Caspasas
CCAO	Oclusión de la Arteria Carótida Común
CD31	Cúmulo Diferencial 31
CP	Capa Polimórfica
EO	Estrés Oxidativo
EVC	Enfermedad Vascular Cerebral
fEPSP	Potencial Post-Sináptico Excitatorio de campo
FGF2	Factor de Crecimiento Derivado de Fibroblastos 2
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína

FM	Fibra Musgosa
GD	Giro Dentado
H	Hilus
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
i.p.	Intraperitoneal
IMF	Intensidad Media de la Flourescencia
MOMP	Eventos Mitocondriales de Permeabilización de la Membrana externa
MRS	Espectroscopía de Resonancia Magnética
NGF	Factor de Crecimiento Neural
NT-3	Neurotrofina 3
PBS	Buffer Fosfato Salino
PECAM-1	Molécula de Adhesión Celular Endotelial Derivada de Plaquetas 1
PFA	Paraformaldehído
PHD	Enzimas Prolilhidroxilasas
PI3K	1-fosfatidil-1D-mio-inositol-4,5-bifosfato-3-fosfotransferasa
pO₂	Presión de Oxígeno
PRF	Post-Reperfusión
pVHL	Proteína ligasa de ubiquitina Von Hippel Landau
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROI	Región de Interés
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno

Sch	Fibras Colaterales de Schaffer
SG	<i>stratum granulosum</i>
SL	<i>stratum lucidum</i>
SLM	<i>stratum lacunosum-moleculare</i>
SM	<i>stratum moleculare</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SO	<i>stratum oriens</i>
SP	<i>stratum pyramidale</i>
SR	<i>stratum radiatum</i>
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UA	Unidades Arbitrarias
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VEGFR-2	Receptor para VEGF tipo II

RESUMEN

La isquemia es un estado que genera estrés celular originado por la disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo y, en consecuencia, la disminución del aporte de oxígeno, de nutrientes y eliminación de productos metabólicos. Diversos estudios han demostrado que la región compuesta por el giro dentado y la subregión CA3 es menos vulnerable al daño isquémico que la subregión CA1 de la formación hipocampal, una estructura cerebral involucrada en diversos procesos de memoria y aprendizaje. Utilizando un modelo de oclusión de arteria carótida común (10 minutos de oclusión), se evaluaron los cambios estructurales, la expresión de marcadores de oxidación proteica, la expresión de los marcadores de respuesta a la hipoxia VEGF y CD31, así como la expresión de Caspasa-3 en regiones específicas del hipocampo a los días 1, 2, 7 y 15 de post-reperfusión (PRF) en respuesta a la oclusión arterial temporal. Se obtuvieron secciones coronales de tejido cerebral y por medio de inmunofluorescencia se estudió la expresión de los marcadores mencionados. Al día 7 PRF, la oclusión arterial evidenció alteraciones estructurales en el giro dentado y en las subregiones CA3 y CA1. La oxidación de proteínas se presentó desde el día 1 PRF. La expresión de VEGF y CD31 alcanzó su máxima expresión al día 15 PRF, mientras que para el caso de la Caspasa-3, ésta mostró una expresión transitoria que alcanzó su máximo al día 2 PRF. Los resultados de este trabajo confirman que existe una vulnerabilidad selectiva de las diferentes regiones hipocampales al daño generado por isquemia y documentan por primera vez, que los marcadores de hipoxia y de daño isquémico se expresan de manera temporal y específica para el giro dentado, y las subregiones CA3 y CA1 del hipocampo.

ABSTRACT

The cell damage that goes after an ischemic insult is a consequence of the transient or permanent decrease in blood flow and reduction of the oxygen supply, nutrients and elimination of metabolic products. It is already known that hippocampal formation, exhibit differential vulnerability to ischemic damage. Whereas the dentate gyrus and area CA3 are less vulnerable, area CA1 has a marked vulnerability to ischemic insult. In this study, we evaluated structural changes, protein oxidation markers, expression of VEGF and CD31 as well as the expression of Caspase-3 in specific regions of the hippocampal formation after unilateral common carotid artery occlusion surgery. Brain tissue was collected at 1, 2, 7 and 15 days after the occlusion and immunohistochemistry analysis was performed on coronal sections of the hippocampus. A series of structural changes were observed at day 7 PRF in the entire hippocampal formation. The protein oxidation was present since day 1 PRF. VEGF and CD31 exhibited a temporal pattern with a maximal expression at day 15 PRF. Lastly, caspase-3 exhibited maximal expression during day 2 PRF in all regions, but decreased to levels below baseline at day 7 PRF in area CA3. These results support the idea that hippocampal formation exhibits selective vulnerability to ischemic insult, and shows for the first time that the markers of hypoxia and ischemic damage display a temporal and specific expression in the dentate gyrus and subregions CA3 and CA1 of the hippocampus.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Enfermedad Vascular Cerebral

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Enfermedad Vascular Cerebral (EVC) es una patología de elevada prevalencia, morbilidad y mortalidad. Se caracteriza por el desarrollo rápido de signos y/o síntomas, correspondientes usualmente a una afección neurológica, focal o global, que persisten por más de 24 horas y que pueden conducir a la muerte, sin otra causa aparente que un origen vascular (W.H.O., 2012).

La EVC aguda es un problema de salud pública tanto en países industrializados como en vías de desarrollo; representa la segunda causa de muerte a nivel mundial en personas mayores de 60 años y la quinta para personas de 15 a 59 años. La EVC junto con la EVC progresiva (demencia vascular y deterioro cognitivo vascular), son las causas más importantes de discapacidad en adultos.

Actualmente cada año, 15 millones de personas sufren un accidente vascular cerebral, de los cuales, aproximadamente 6 millones mueren y otros 5 millones quedan con secuelas permanentes y se proyecta que para el año 2030 la cifra de muerte se elevará a 8 millones por año (Donnan *et al.*, 2008; Grysiewicz *et al.*, 2008).

El término EVC se utiliza para abarcar un grupo heterogéneo de trastornos en la irrigación cerebral, de forma transitoria o permanente y se caracteriza por un desarrollo rápido de síntomas y signos neurológicos que traducen una disfunción cerebral, espinal o retiniana, debidos a una oclusión arterial (isquemia), venosa (trombosis venosa) o ruptura arterial (hemorragia) (RENAMEVASC, 2014).

Por su naturaleza, se puede clasificar a la EVC en tres subtipos principales: infarto cerebral, hemorragia intracerebral y hemorragia subaracnoidea. Los procesos patológicos que llevan al desarrollo de ésta involucran la ruptura de un vaso sanguíneo, la oclusión luminal de éste por un trombo o un émbolo o alteraciones en la

permeabilidad de la pared vascular, así como alteraciones en la viscosidad sanguínea o en el flujo sanguíneo cerebral (Donnan *et al.*, 2008; Raz *et al.*, 2016).

1.2. Daño cerebral isquémico

La isquemia cerebral es el resultado de la disminución del flujo sanguíneo cerebral a un grado tal que resulta insuficiente para el mantenimiento de la homeostasis. Cuando esta condición se prolonga provoca alteraciones a nivel metabólico y bioquímico que conducen a la muerte celular, alterando el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) (Harakuni y Bhardwaj, 2006; Hofmeijer y van Putten, 2012).

El daño cerebral isquémico es un término de diagnóstico que comprende un conjunto de lesiones fisiopatológicas y moleculares inducidas por la hipoxia, la isquemia, la citotoxicidad, o la combinaciones de estas condiciones.

La disminución de la perfusión cerebral sucede cuando el flujo sanguíneo se encuentra parcial o completamente restringido; cuando la presión arterial es muy baja, o cuando la circulación cesa por completo. Estas condiciones privan al cerebro (unidad neurovascular, que está constituida de células endoteliales, astrocitos y neuronas) (Attwell y Ladecola, 2002) de diversos nutrientes, oxígeno y glucosa y alteran el proceso de intercambio de desechos metabólicos por nutrientes, facilitando así el desarrollo de un estado isquémico. Este estado se caracteriza por la insuficiencia de energía celular (ATP), despolarización celular, aumento en el calcio intracelular, exceso de liberación de neurotransmisores (especialmente neurotransmisores excitadores), producción de radicales libres de oxígeno, peroxidación de lípidos, y alteraciones en la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral en los niveles micro y macroscópicos (Busl y Greer, 2010; Calvert y Zhang, 2005).

Los efectos de una oclusión arterial local en el tejido cerebral dependen de la localización y tiempo de la oclusión, así como la circulación colateral y los canales anastomóticos presentes en la zona afectada. Esto determina directamente la

extensión de tejido lesionado y, por lo tanto, la gravedad del infarto y sus manifestaciones clínicas (Donnan et al., 2008). La restricción del flujo sanguíneo en el cerebro conlleva a la muerte neuronal o infarto. Sin embargo, no todas las áreas del cerebro son igualmente vulnerables a los efectos perjudiciales de la isquemia y sus efectos tienden a ser más pronunciados en el tronco cerebral superior, la materia blanca y estructuras subcorticales suministradas por las ramas distales de los vasos sanguíneos, incluida la región CA1 del hipocampo y las capas neocorticales 3, 5 y 6 (Arbelaez *et al.*, 1999; Busl y Greer, 2010; Chalela *et al.*, 2001).

1.3. Modelos para el estudio de la isquemia cerebral

Diferentes modelos experimentales se han utilizado para el estudio del daño celular por isquemia. Existen múltiples modelos *in vitro*, entre ellos, los cultivos celulares y las rebanadas frescas de cerebro (Cho *et al.*, 2007), que se basan en la exposición de los tejidos a periodos controlados de anoxia (ausencia de oxígeno) o isquemia (ausencia de glucosa y oxígeno). Estos modelos han proporcionado información relevante sobre las alteraciones celulares y los procesos fisiopatológicos que suceden durante la isquemia.

En cuanto a los modelos *in vivo*, los más utilizados se basan en la generación de isquemia global o de isquemia focal empleando diferentes cepas de roedores. Estos modelos consisten en la oclusión vascular para disminuir la irrigación cerebral de manera completa en el cerebro (isquemia global) o la oclusión específica de un vaso sanguíneo para comprometer una zona determinada (tabla 1) (Nitsch *et al.*, 1989; Schmidt-Kastner y Freund, 1991).

Tabla 1. Modelos experimentales de isquemia cerebral. Se enuncia la mayoría de los modelos experimentales en animales para el estudio de la EVC, así como sus autores y el año en que fueron propuestos (Prieto-Arribas *et al.*, 2008).

Modelos de isquemia global en animales		Autor, año	
Interrupción de la circulación cerebral	Interrupción completa de la circulación cerebral	Oclusión de 2 vasos	Levine, 1966
		Oclusión de 2 vasos + hipotensión/hipoxia	Eköf, 1972
		Oclusión de 4 vasos	Pusinelli, 1979 Sugio, 1988
		Estrangulación cervical	Rabat, 1938
	Decapitación	Hinzen, 1972	
	Interrupción incompleta de la circulación cerebral	Hipotensión arterial	Shibata, 2004 Hai, 2002
		Hipertensión intracraneal	Siesjö, 1970
Modelos de isquemia cerebral focal en animales			
Oclusión de la arteria carótida común	Oclusión de la arteria carótida común	Levine, 1966 Nelly, 2001	
	Encefalopatía anóxica-isquémica	Levine, 1960	
Oclusión de la arteria cerebral media	Oclusión transorbital	Hudgins, 1970 Hossman, 1980	
	Oclusión intraluminal mediante un filamento	Koizumi, 1986 Zea Longa, 1989 Belayev, 1966 Smith.Elsaesser, 1998	
	Oclusión intraluminal mediante embolia de coágulo de sangre	Overgaard, 1992 Overgaard, 1994 Zhang, 1997	
Oclusión microvascular de la arteria cerebral media	Oclusión fototrombótica	Watson, 1985	
	Agregados plaquetarios	Fieschi, 1975	
	Inyección intracraneal de endotelinas	Sharkey, 1995 Henshall, 1999	
Infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas		Yamori, 1976	

1.3.1. Modelo de oclusión de la arteria carótida común

El modelo de oclusión de la arteria carótida común (CCAO) fue desarrollado y propuesto por Levine en el año de 1966, quien ocluyó la arteria carótida común izquierda o derecha a gerbos adultos. Las alteraciones cerebrales fueron evaluadas en los siguientes 3-5 días posteriores a la oclusión de la arteria mediante la tinción de

hematoxilina-eosina. Se detectó infarto masivo en el hemisferio ipsilateral y, de manera específica, infartos de gran tamaño en el cuerpo estriado, la corteza cerebral, el hipocampo y el diencéfalo. También, se detectó necrosis selectiva en las neuronas piramidales del hipocampo y daño en la retina de los gerbos. No se encontraron diferencias significativas dependientes del sexo (hembra o macho) o de la arteria que se ocluyera (izquierda o derecha). Utilizando el mismo modelo, el daño isquémico fue replicado en ratas de la cepa Wistar y en hámsteres (Levine y Payan, 1966).

1.4. Mecanismos celulares y moleculares en respuesta a la hipoxia

La oxigenación de cualquier tejido se basa en el equilibrio entre el aporte y el consumo de oxígeno (Dewhirs, 2009; Rabbani *et al.*, 2010). Cualquier disminución en su disponibilidad es detectada rápidamente, generando cambios que evitan daños hipóxicos potencialmente peligrosos. Existen diversos sistemas sensores de oxígeno, que varía de un órgano a otro y de célula a otra de acuerdo con un umbral de activación (Acker *et al.*, 2006). Se ha descrito un mecanismo básico de detección de oxígeno integrado por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF *hypoxia inducible factor*), las enzimas prolihidroxilasas (PHD), la proteína ligasa de ubiquitina von Hippel Landau (pVHL) y el proteosoma 26S (Brüne y Zhou, 2007).

Mecánísticamente, HIF promueve la regulación de genes inducibles por hipoxia, tales como los que controlan la eritropoyesis, glicólisis y factores proangiogénicos (Brüne y Zhou, 2007; Caramelo *et al.*, 2006; Dewhirs, 2009; Reyes *et al.*, 2012; Yoshimura *et al.*, 2013). Estudios recientes sugieren que durante la hipoxia se presenta un aumento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS *Reactive Oxygen Species*) que contribuye a la estabilización de HIF-1 α (Brüne y Zhou, 2007; Irwin *et al.*, 2009; Wang y Michaelis, 2010; Rabbani *et al.*, 2010). HIF-1 α promueve el crecimiento y la angiogénesis por la sobreexpresión de factores como el VEGF (Shapiro *et al.*, 2008). En conjunto, las principales funciones de estas moléculas son inducir la proliferación para promover la supervivencia celular, mejorar la migración y la permeabilidad endotelial de las células (figura 1). De esta forma, HIF-1 α y VEGF contribuyen de manera sustancial a la angiogénesis (Zepeda *et al.*, 2013).

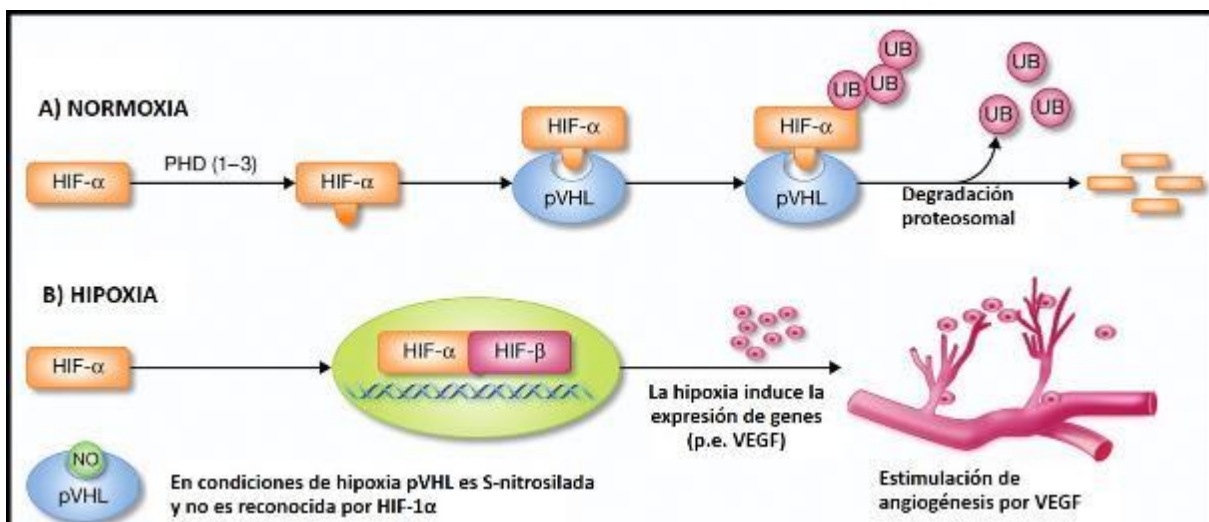


Fig. 1. Papel de pVHL en la expresión de VEGF y angiogénesis. A) en presencia de oxígeno (normoxia), se hidroxilan residuos de prolina en el dominio de degradación dependiente de oxígeno de HIF. Esto permite que HIF- α interactúe con pVHL, causando su degradación a través de la ubiquitinación. B) en respuesta a un bajo nivel de oxígeno (hipoxia), pVHL es S-nitrosilado, impidiendo que HIF- α interactúe con pVHL. HIF- α estimula la expresión de VEGF, ambos a su vez estimulan la angiogénesis (modificado de Rahimi, 2012).

1.5. El VEGF como marcador de respuesta a la hipoxia

El VEGF es un péptido angiogénico que se libera en respuesta a la hipoxia en el desarrollo y mantenimiento del tejido neoplásico, así como en el proceso normal de cicatrización y sanación de los tejidos. Actúa sobre las células endoteliales para promover la formación de los vasos sanguíneos (Neufeld *et al.*, 1999; Petrova *et al.*, 1999). La acción angiogénica del VEGF implica un efecto antiapoptótico que promueve la supervivencia de las células endoteliales mediada a través del receptor VEGFR-2 y de la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) y Akt (Gerber *et al.*, 1998).

El crecimiento vascular también depende de la señalización paracrina de otros factores vasculares como el factor derivado de plaquetas (PDGF) y las angiopoyetinas (Ang). Se ha descrito que estos factores estabilizan la vasculatura y protegen al endotelio de diferentes estímulos de daño, a través de las señales de supervivencia. Estudios recientes sugieren que las células endoteliales (en específico, los pericitos que cubren al endotelio) son susceptibles a la isquemia (Hall *et al.*, 2014) y que las células endoteliales son capaces de producir VEGF endógeno (Lee *et al.*, 2007). El

VEGF endógeno producido por las células endoteliales es secretado de manera autocrina y paracrina y es un factor vascular muy importante para la homeostasis vascular, en especial para la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos (figura 2) (Heloterä y Alitalo, 2007).

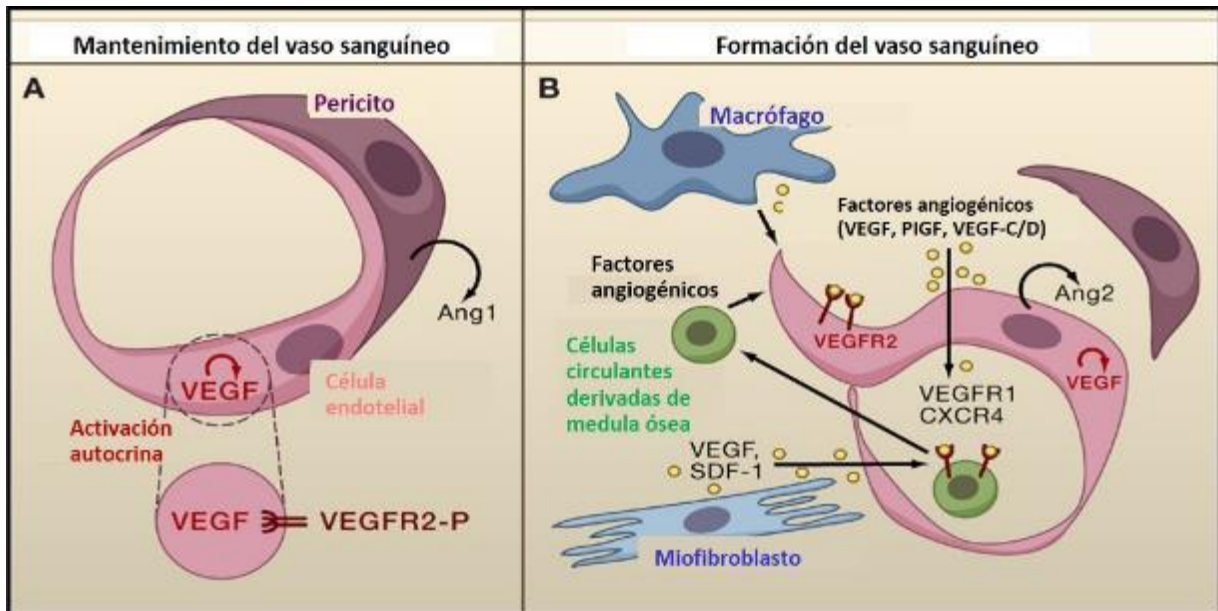


Fig. 2. Efectos autócrinos y parácrinos del VEGF en capilares. **A)** En condiciones de estado estacionario los pericitos producen angiopoietina 1 y niveles bajos de VEGF. El VEGF producido es secretado de manera autocrina y paracrina para promover estimulación del VEGFR2 que promueve la supervivencia celular. **B)** Diferentes vías son activadas durante la angiogénesis por factores angiogénicos provenientes del endotelio y de otros tipos celulares, incluyendo las células del sistema inmune (modificado de Heloterä y Alitalo, 2007).

Se conoce que el VEGF se expresa de manera ubicua en el cerebro (Marti, H.H. y Risau, W., 1998; Monacci, W.T. *et al.*, 1993) y que su expresión se induce durante la hipoxia y la isquemia cerebral (Forsythe *et al.*, 1996; Marti y Risau, 1998; Marti *et al.*, 2000). En el cerebro, el VEGF tiene efectos neurotróficos directos ya que estimula el crecimiento de los axones, aumenta la supervivencia de neuronas en los ganglios cervicales y de la raíz dorsal en ratón (Sondell *et al.*, 1999), y promueve la supervivencia de neuronas mesencefálicas de rata *in vitro* (Silverman *et al.*, 1999).

1.5.1. Efectos protectores del VEGF en la isquemia cerebral

Las neuronas son susceptibles a la hipoxia y a la reducción del flujo sanguíneo cerebral durante la isquemia (Lipton, 1999). Sin embargo, las respuestas adaptativas endógenas a nivel celular, local y sistémicas pueden proteger al tejido cerebral de una lesión hipóxico-isquémica. Durante la hipoxia, a nivel celular, se inducen algunos factores neuroprotectores, como la eritropoyetina, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Noble *et al.*, 2011) y el VEGF que generan la supervivencia de células neuronales (Marti, 2004; Wang *et al.*, 2005).

En la isquemia cerebral, el VEGF ejerce un efecto angiogénico mediante el aumento de la densidad capilar y promueve la neuroprotección y la neurogénesis (Sun *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000). Otros estudios han demostrado que el VEGF reduce el tamaño del infarto, mejora los déficits neurológicos y previene el daño neuronal retardado (Sun *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005).

1.6. La proteína PECAM-1 (CD31) como marcador de angiogénesis

La angiogénesis es una característica esencial de una serie de procesos fisiológicos importantes, por ejemplo, la cicatrización de heridas, la reparación y desarrollo de tejidos, entre otros (DeLisser *et al.*, 1994). Este proceso también se ha observado en condiciones patológicas como la diseminación tumoral (Folkman, 1995). Independientemente del proceso, la angiogénesis es un proceso de pasos múltiples en el cual las células endoteliales de los capilares rompen sus uniones normales célula-célula, migran y proliferan en la matriz extracelular perivascular, dónde reforman las asociaciones célula-célula para la creación de nuevos capilares (Folkman y Shing, 1992).

Durante el proceso de angiogénesis, las interacciones adhesivas entre células endoteliales y de éstas con la matriz extracelular son muy importantes. Los receptores de adhesión median tales interacciones (McCormick y Zetter, 1992; Polverini, 1996;

Bischoff, 1997). Las células endoteliales expresan algunas integrinas que son moléculas de adhesión celular y se ha descrito que interactúan con la matriz extracelular, dentro de las cuáles se encuentra la Molécula de Adhesión Celular Endotelial Derivada de Plaquetas 1 (PECAM-1), también conocida como CD31.

PECAM-1 es una glicoproteína de membrana de 130 KD de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Muller *et al.*, 1989; Albelda *et al.*, 1990; Newman *et al.*, 1990), que es capaz de mediar tanto la adhesión homofílica como la heterofílica (DeLisser *et al.*, 1994) y cuya expresión se ha caracterizado entre las uniones de las células endoteliales, es decir, de manera intercelular (DeLisser *et al.*, 1997). Los estudios de Albelda y cols. (1990) sugirieron un papel potencial para PECAM-1 en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por otra parte, en 1997, DeLisser y cols. estudiaron el efecto de la inhibición de la función de la molécula endotelial de adhesión célula-célula, PECAM-1, en rata y en modelos murinos para angiogénesis. En este estudio, un anticuerpo policlonal para PECAM-1 humano, que detecta también al PECAM-1 de rata, bloqueó *in vitro* la formación de tubos por las células endoteliales capilares de rata y la neovascularización *in vivo* en córnea de rata inducida por citocinas. Tomando en conjunto estos resultados, se cuenta con evidencia de que la PECAM-1 está implicada en la angiogénesis y se sugiere que las interacciones de las moléculas endoteliales de adhesión célula-célula son importantes en la formación de nuevos vasos sanguíneos (DeLisser *et al.*, 1997).

1.7.El pimonidazol como herramienta para localizar zonas hipóxicas en los tejidos debido a la generación de estrés oxidativo

En 1976 Varghese y cols., reportaron que los 2-nitroimidazoles (precursores del pimonidazol) forman aductos en células hipóxicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Varghese *et al.*, 1976). Posteriormente se encontró, que los aductos se forman con los grupos tiol en las proteínas, péptidos y/o aminoácidos de manera que todos los átomos del anillo y de la cadena lateral de los 2-nitro-imidazoles son retenidos (Chacon *et al.*, 1988; Raleigh *et al.* 1985, Raleigh y Koch, 1990; Varghese, 1983). Para que se lleve a

cabo la unión de los 2-nitro-imidazoles a los grupos tioles se necesitan condiciones de hipoxia (presión parcial de oxígeno menor a 10 mm de Hg, $pO_2 < 10$ mm Hg) y de enzimas redox en las células hipóxicas; pero la unión del *hypoxyprobe* (pimodidazol) no depende de la presencia de cualquier enzima redox en particular, sino que se necesita de concentraciones bajas de oxígeno. Además, grandes variaciones en los niveles de NADH y NADPH no cambian la unión dependiente de oxígeno (Arteel *et al.*, 1995; Arteel *et al.*, 1998).

En 1981, Chapman demostró que la unión del 2-nitroimidazol dependiente de oxígeno era similar a la resistencia a la radiación y propuso la unión del 2-nitroimidazol como un marcador de hipoxia en tejido normal y maligno (Chapman *et al.*, 1981).

En 1986, Raleigh y cols. a través de sus investigaciones de espectroscopia de resonancia magnética (MRS) de hipoxia tumoral con el 2-nitroimidazol hexafluorinado, CCI-103F, concluyeron que la evaluación histológica de la hipoxia podría ser un complemento útil para ensayos no invasivos (Jin *et al.*, 1990; Raleigh *et al.*, 1986; Raleigh *et al.*, 1991) y desarrollaron la técnica de marcadores de hipoxia inmunoquímica, basada en el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales contra aductos de proteínas de los 2-nitroimidazoles.

En 1999, Raleigh y cols. reportaron que la inmunotinción con pimodidazol estaba fuertemente relacionada con las mediciones de oxígeno utilizando electrodos en tumores de ratón, en el que el nivel de oxigenación fue manipulado intencionadamente (Raleigh *et al.*, 1999).

Diversos estudios han utilizado el pimodidazol como método de detección de hipoxia (Bussink *et al.*, 2000; Ljungkvist *et al.*, 2000; Pogue *et al.*, 2001). Un amplio número de estudios preclínicos y clínicos han demostrado que los ensayos inmunohistoquímicos con pimodidazol proporciona mediciones cuantitativas de la hipoxia y dan una visión de las relaciones micro regionales entre la hipoxia y factores tales como la necrosis, la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la expresión génica de reguladores del oxígeno (Hypoxyprobe Store, 2006).

El metabolismo del pimonidazol se resume en la figura 3 donde se muestra que el O_2 compite por la adición del primer electrón para el pimonidazol, que representa la dependencia de la presión de oxígeno (pO_2) para su activación y su unión. Con base en experimentos de laboratorio, se estima que el 20% del pimonidazol activado se une a los grupos tioles celulares y el 80% no se une, pero es fragmentado por hidrólisis (Hypoxyprobe Store, 2006). El pimonidazol está sujeto al metabolismo oxidativo que conduce a derivados de N-óxido, sulfato y glucuronato que son fácilmente excretables. Estas vías oxidativas no parecen interferir con la utilidad de pimonidazol como un marcador de hipoxia.

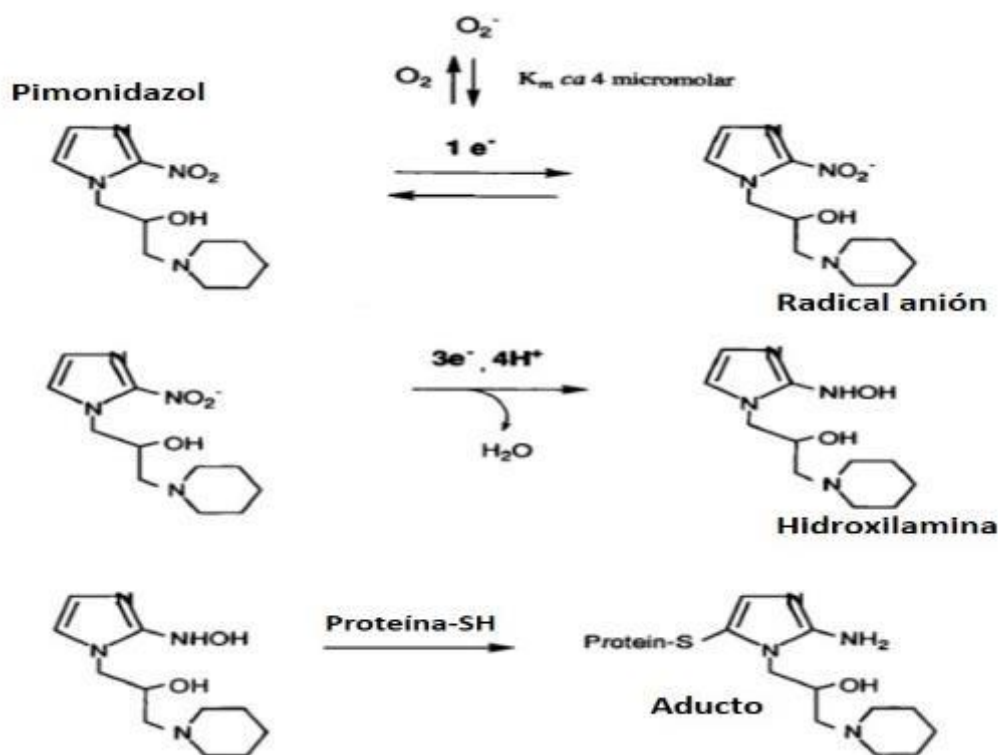


Fig. 3. Esquema de la activación reductiva del pimonidazol *in vivo* en condiciones de hipoxia. En condiciones de hipoxia, la primera etapa en el metabolismo del pimonidazol es la adición de un electrón del sistema de transporte electrónico de la célula para formar un radical anión nitro. Este paso en el proceso reductivo es totalmente inhibido a concentraciones de oxígeno $\geq 14 \mu M$ (modificado de Varia *et al.*, 1988).

1.8. La caspasa 3 como indicador de daño isquémico

La apoptosis o muerte celular programada es una forma de muerte celular genéticamente definida y controlada, por la que las células inducen su propio fin en respuesta a determinados estímulos. Ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmune, con el objetivo de eliminar células no deseadas y preservar la homeostasis (Ellis *et al.*, 1991).

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales, uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil aspartato proteasas (caspasas). Algunas caspasas son iniciadoras y otras efectoras del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La cadena de degradación proteica tiene cortes sucesivos dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en dónde participan varios complejos moleculares (Pérez-Machado y Lie-Concepción, 2012). Existen dos principales vías de apoptosis que se distinguen en función de la participación o no de las caspasas, la apoptosis dependiente de caspasas y la inducida por la GzmA (independiente de caspasas) (Wuchter *et al.*, 2002).

La apoptosis dependiente de caspasas es la vía de muerte celular programada clásica. Por lo general involucra la participación en cascada de las caspasas 8, 9, 12, 7 y 3. También existe una variedad de receptores involucrados en este tipo de vía, cómo el receptor de TNF- α , el receptor de FasL, los TLR's, entre otros (Hongmei, 2012).

En los mamíferos se han descrito dos rutas principales para la activación de la cascada de caspasas: la vía de la muerte celular extrínseca (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998), que requiere receptores de la superficie celular, y la vía de muerte celular intrínseca que se caracteriza por eventos mitocondriales de permeabilización de la membrana externa (MOMP), en los cuales miembros de la familia de Bcl-2 juegan un papel esencial (Green y Kroemer, 2004). La familia de Bcl-2 se divide en dos

subgrupos: proapoptóticos (con proteínas tales como Bax, Bak) y antiapoptóticos (incluyendo Bcl-2 y Bcl-XL, entre otros). Como consecuencia de los estímulos apoptóticos, las proteínas proapoptóticas sufren cambios conformacionales (Er *et al.*, 2006) y constituyen oligómeros, causando formación de poros en la membrana externa mitocondrial a través de MOMP (Kroemer *et al.*, 2007). La actividad de las proteínas proapoptóticas resulta en la liberación del citocromo c al citosol, lo que induce la formación de APAF1 que contiene un complejo macromolecular, denominado apoptosoma (actividad que puede ser contrarrestada por miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2) (Labi *et al.*, 2006). Una vez que el apoptosoma se forma, se recluta a la procaspasa 9 a través de las interacciones con CARD, dichas interacciones implican el N-terminal CARD de APAF1 (Hofmann y Bucher, 1997). Esto actúa como un motivo de acoplamiento para la procaspasa 9 y para el complejo apoptosoma APAF1-caspasa 9. Posteriormente, se recluta de manera eficiente y directamente se corta a la procaspasa-3 (Cain *et al.*, 2000; D'Amelio *et al.*, 2012).

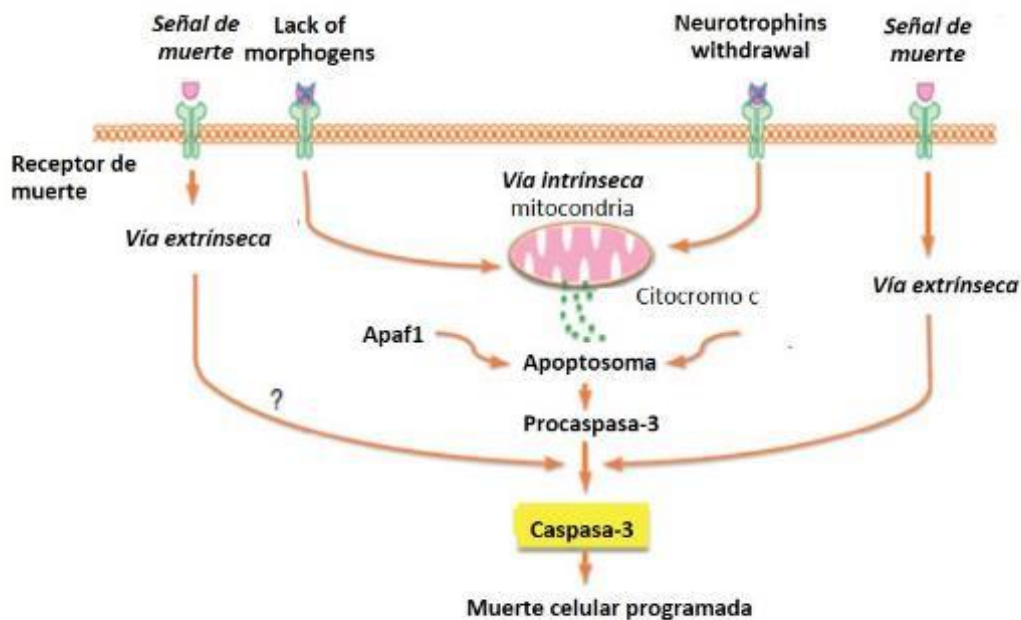


Fig. 4. Caspasa-3 y la apoptosis. Las vías de la muerte celular intrínseca y extrínseca convergen en la activación de la caspasa 3 (modificado de D'Amelio *et al.*, 2012).

Las vías de la muerte celular intrínseca y extrínseca convergen en la caspasa 3, que, junto con otras caspasas efectoras, dirigen el desmantelamiento de la estructura celular a través de la ruptura de sustratos específicos (figura 4) (Taylor *et al.*, 2008).

En el daño isquémico moderado se induce preferentemente la muerte celular vía apoptosis. Esto se debe a que la zona de penumbra isquémica sufre una lesión más leve y preserva ATP. En la isquemia, los desencadenantes de la apoptosis son los radicales libres de oxígeno, la activación del receptor de muerte, daño al ADN, la activación de las proteasas y el desequilibrio iónico (Doyle *et al.*, 2008, Kerr, 1965; Kerr *et al.*, 1972; Gonzalez *et al.*, 2006).

1.9. El hipocampo

El hipocampo es una estructura subcortical cerebral implicada en procesos de memoria y aprendizaje localizada dentro del sistema límbico que, junto con un grupo mayor de arreglos conforman la formación hipocampal. La formación hipocampal presenta una alta organización celular y regiones bien definidas (Ramón y Cajal, 1911; Amaral y Lavenex, 2006). Esta estructura está conformada por el giro dentado (GD) y por el hipocampo propiamente dicho, el cual se encuentra subdividida en tres regiones CA3, CA2 y CA1 (CA proviene de la nomenclatura *Cornus Ammonis* ó Cuerno de Amón y hace referencia a estructuras laminadas en forma semicircular) (Amaral y Lavenex, 2006).

El hipocampo posee una población heterogénea de neuronas con características morfológicas y de conectividad única. El circuito hipocampal está formado por el GD que se caracteriza por tener una capa empaquetada de células pequeñas granulares envueltas alrededor del extremo del hipocampo, formando una cuña puntiaguda en algunas secciones transversales, un semicírculo en otros. Seguido de las regiones de CA. Todas las regiones CA presentan células piramidales densamente empaquetadas. Posterior a CA1 se encuentra el subículo, presubiculum

y parasubiculum, seguido por una región de proyecciones axonales a la corteza (Amaral y Lavenex, 2006).

Todas las regiones CA del hipocampo están constituidas por el estrato principal, llamado *stratum pyramidale* o capa piramidal. Por debajo de esta capa, se encuentra el *stratum oriens*, que contiene las dendritas basales de las células piramidales y algunas interneuronas. En la región CA3, existe un estrato justo encima del *stratum pyramidale*, formado por los axones de las neuronas granulares llamados fibras musgosas (FMs), y denominado *stratum lucidum*. El *stratum radiatum* está localizado por arriba de las FMs en la región CA3 y se encuentra encima de la capa piramidal de CA2 y CA1. Por último, la capa más externa de CA3 es el *stratum lacunosum-moleculare* (figura 5) (Johnston y Amaral, 2004; Andersen *et al.*, 2006).

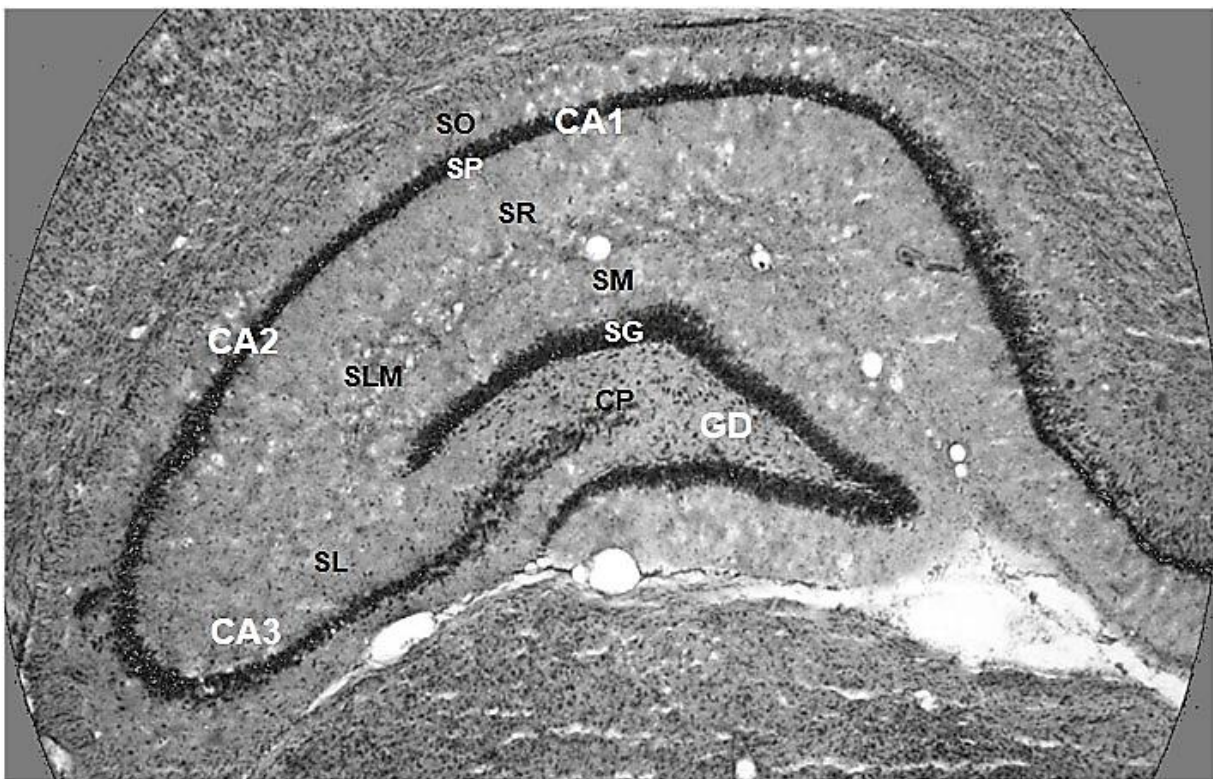


Fig. 5. Microfotografía de un corte coronal de hipocampo de rata. Tinción de hematoxilina y eosina, se representan las principales regiones y estratos del hipocampo. **CA** Cuerno de Amón; **SO** *stratum oriens*; **SP** *stratum pyramidale*; **SL** *stratum lucidum*; **SR** *stratum radiatum*; **SLM** *stratum lacunosum-moleculare*; **GD** giro dentado; **SM** *stratum moleculare*; **SG** *stratum granulosum*; **CP** capa polimórfica (hilus).

Múltiple evidencia experimental ha demostrado que el hipocampo participa en la modulación de distintos procesos de la memoria (adquisición y consolidación) mediante la percepción de estímulos ambientales de tipo sensorial (olores, objetos visuales y sonido) y aquellos que representan un orden temporal, espacial o novedoso (Kesner y Hopkins, 2006; O'Keefe y Nadel, 1978; Squire, 1994; Sutherland y Rudy, 1989). También se conoce que participa en la formulación de una respuesta ante la presencia de algún estímulo sensorial. Por ello, podemos señalar que el hipocampo es una estructura cerebral íntimamente relacionada a la integración del proceso del aprendizaje y la memoria (Leuner y Gould, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1. Daño isquémico en el hipocampo

Diversos estudios han demostrado que los periodos interrumpidos de isquemia cerebral generan muerte neuronal retardada, que se produce pocos días después del daño y que depende de la gravedad de la isquemia (Kirino, 1982; Pulsinelli *et al.*, 1982; Zola-Morgan *et al.*, 1986; Zola-Morgan *et al.*, 1992). Este fenómeno se ha observado en diversas áreas cerebrales (Rod y Auer, 1992), incluido el hipocampo.

Estudios anatómicos e histológicos coinciden en que la región CA1 del hipocampo (DeGirolami y Marcoux, 1984; Larsson *et al.* 2001) es la zona más vulnerable al daño isquémico, tanto en humanos (Zola-Morgan *et al.* 1986), como en modelos *in vivo* e *in vitro* en roedores (Aitken y Schiff 1986; Schmidt-Kastner y Freund 1991; Gee *et al.*, 2006; Daisu *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo mueren dentro de los 3-7 días después de la isquemia transitoria del prosencéfalo, mientras que las neuronas de la región CA3 y las células granulares dentadas permanecen intactas (Kirino, 1982; Pulsinelli *et al.*, 1982).

Los estudios *in vivo* han permitido establecer que las diferentes poblaciones neuronales del hipocampo presentan un grado de vulnerabilidad único a la isquemia. Por ejemplo, 5 minutos de isquemia global causa la muerte retardada de una proporción mayor de neuronas piramidales de la región CA1, sin efectos sobre otras poblaciones, mientras que 20 minutos de isquemia global causa la muerte celular de neuronas CA3 (en adición a las neuronas de CA1) sin generar un efecto visible sobre las neuronas granulares del giro dentado (figura 6) (Kirino y Sano, 1984; Kirino *et al.*, 1985).

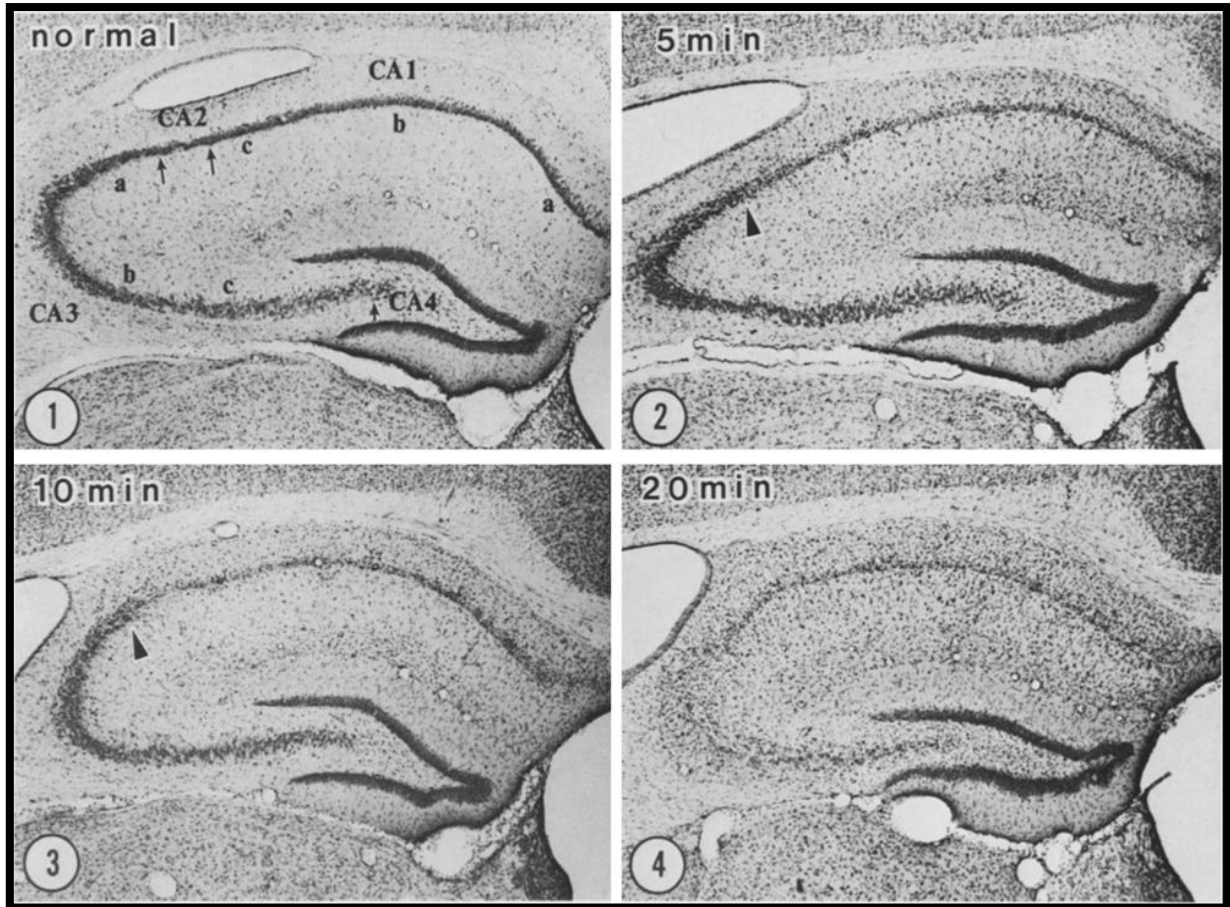


Fig. 6. Daño isquémico al hipocampo. Cortes coronales hipocámpales obtenidos de cerebro de gerbos de Mongolia con oclusión bilateral de las arterias carótidas durante 0 (normal), 5, 10 y 20 minutos a los 7 días post-reperusión. Las rebanadas se tiñeron con violeta de cresilo. Las muestras se procesaron por microscopía de campo claro para observar cambios en la densidad neuronal (Kirino y Sano, 1984).

Por otro lado, en la preparación *in vitro* de rebanadas de hipocampo sometidas a isquemia, ocurre un patrón electrofisiológico de daño y pérdida de la actividad sináptica similar a lo observado durante la hipoxia y/o aglicemia en los modelos *in vivo* (Kreisman *et al.*, 2000). La alteración de la transmisión sináptica irreversible después de un periodo de hipoxia aguda es un indicador fisiológico de daño (Schiff y Somjen 1987; Schurr y Rigor., 1989). Estudios recientes de nuestro laboratorio, empleando un modelo *in vivo* de isquemia focal transitoria, muestran cambios en la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal en las diferentes regiones del hipocampo (Figura 7) (Tecuatl y Galvan, en proceso). Los resultados indican que a los 7 días post-reperusión (PRF) de la oclusión de la arteria carótida común (CCAO) por 10 minutos

se modifica parcialmente las propiedades sinápticas entre las fibras musgosas (axones de las neuronas granulares del giro dentado) y CA3 (neuronas piramidales), ya que se observa un aumento en la excitabilidad neuronal en CA3; en tanto que las sinapsis de la región CA1 (colaterales de Schaffer-CA1), la transmisión sináptica experimenta una disminución. Por ello, podemos concluir que el daño isquémico producido por el modelo de CCAO, reproduce la vulnerabilidad del hipocampo al daño observado en diversas condiciones neuropatológicas.

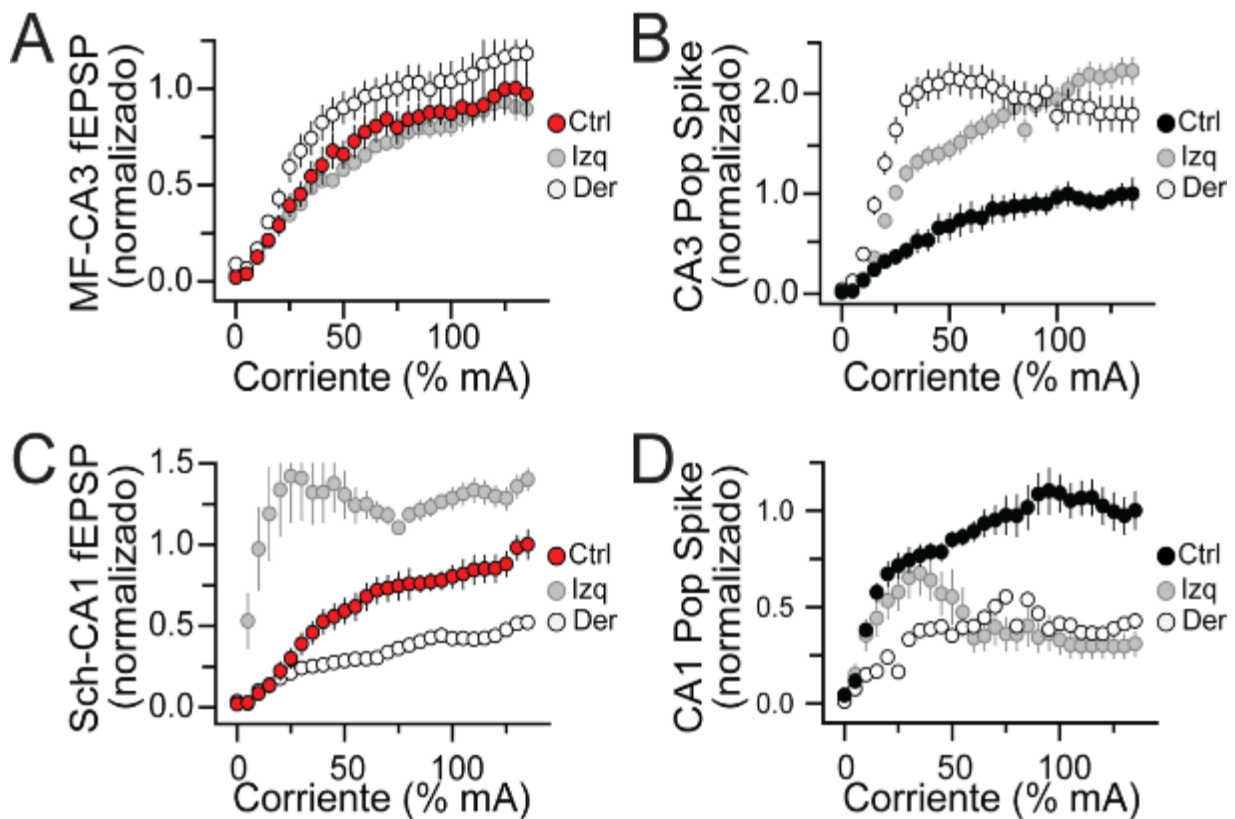


Fig. 7. Efecto de la CCAO sobre la transmisión sináptica de las sinapsis FM-CA3 y Sch-CA1. Curva Entrada-Salida evocada en: A) Sinapsis FM-CA3 dónde no se observan cambios en la amplitud de los fEPSP's en animales con isquemia, en comparación a la obtenida en animales control (círculos rojos). B) CA3 que muestra un incremento en la amplitud de la espiga poblacional en animales con isquemia, en comparación a la obtenida en animales control (círculos negros). C) Sch-CA1 dónde se observa una disminución en la amplitud de fEPSP's en animales con isquemia, en comparación a la obtenida en animales control (círculos rojos). D) CA1 que muestra una disminución en la amplitud de la espiga poblacional en animales con isquemia, en comparación a la obtenida en animales control (círculos negros) (Tecuatl y Galván, en proceso).

3. JUSTIFICACIÓN

La isquemia causa un daño diferencial al hipocampo, que está caracterizado por una alta vulnerabilidad de la región CA1 y mayor resiliencia de la región GD-CA3. Se ha prestado muy poca atención al mecanismo celular que subyace al daño isquémico de la región GD-CA3. Esta característica convierte al hipocampo en un modelo ideal para contrastar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la susceptibilidad diferencial neuronal.

Otros tantos estudios han caracterizado la morfología de la muerte neuronal tras la isquemia, sin embargo, existe información limitada acerca de la expresión de factores de daño isquémico, angiogénicos, de hipoxia, entre otros.

El estudio de los mecanismos subyacentes al daño que genera la isquemia permitirá diseñar estrategias terapéuticas para tratar este padecimiento.

4. HIPÓTESIS

En un modelo experimental, el daño generado por una isquemia focal transitoria de corta duración (≤ 15 minutos), tendrá consecuencias diferentes en las regiones de CA1, CA3 y GD del hipocampo. Lo que se verá reflejado días posteriores al daño isquémico (días post-reperfusión) de la siguiente manera:

- Los cambios morfológicos tras el insulto isquémico se presentarán primero en la región CA1 y después en las regiones GD y CA3.
- La expresión de marcadores de hipoxia (oxidación de proteínas, producción de VEGF y expresión de CD31) se presentará en etapas más tempranas después del insulto isquémico en la región CA1 que en las regiones GD y CA3.
- La expresión del marcador de daño, caspasa 3, se presentará primero en la región CA1 que en el GD y CA3, después del insulto isquémico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar las diferencias en la expresión de marcadores de hipoxia y de daño isquémico en el hipocampo de rata en un modelo de isquemia focal transitoria de corta duración.

5.2. Objetivos específicos

En un modelo experimental de oclusión de la arteria carótida común, utilizando un curso temporal de 1, 2, 7 y 15* días post-reperfusión y analizando las regiones GD, CA3 y CA1 del hipocampo de rata, caracterizar:

1. Los cambios estructurales generados por la CCAO,
2. El daño oxidante a las proteínas tras la isquemia,
3. La expresión de los marcadores de respuesta a la hipoxia VEGF y CD31,
4. La expresión del marcador de daño isquémico caspasa-3.

* Solo para el objetivo específico número 3.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 4 semanas de edad, con un peso de 90-110 g. Se alojaron en condiciones controladas de temperatura (22-24°C), con ciclo invertido luz/oscuridad (12:12 hrs.) con acceso *ad libitum* a alimento y agua.

6.2. Modelo de isquemia focal transitoria

Para realizar el modelo de isquemia focal transitoria, se anestesiaron a los animales con pentobarbital sódico a una dosis de 55 mg/Kg de peso. Después se realizó una traqueotomía y se expuso la arteria carótida izquierda común, se separó el nervio vago sin dañarlo. Posteriormente se ocluyó la arteria con una grapa durante 10 minutos. Cumplido el tiempo se retiró el clamp para restituir el flujo sanguíneo (reperfusión). Se suturó la incisión y se dejó recuperar al animal de la operación durante 3 hrs. bajo una lámpara calefactora, regresándolo después a condiciones controladas previamente descritas (modificado de Levine, 1966). A este grupo se le denominó grupo con CCAO (*Occlusion of the Common Carotid Artery*: oclusión de la arteria carótida común “izquierda”).

Para el grupo control se utilizaron ratas con operación simulada. Para ello se realizó el procedimiento anteriormente descrito, pero sin ocluir la arteria con la grapa. A este grupo se le denominó grupo *Sham*.

Los procedimientos experimentales en los animales se realizaron conforme a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, y fueron aprobados por nuestro Comité de Ética Institucional (CICUAL, CINVESTAV IPN) bajo el número de protocolo 0108-14.

6.3. Marcaje de estrés oxidativo en tejido hipóxico

Para marcar las proteínas dañadas por el estrés oxidativo en el hipocampo (regiones GD, CA3 y CA1), se utilizó el *Hypoxyprobe* TM-1 Plus Kit y fueron detectadas mediante inmunofluorescencia. Se administró una dosis de 60 mg/kg de *hypoxyprobe* vía i.p. Posteriormente a los 30 minutos se obtuvo el tejido cerebral. El *hypoxyprobe* ha sido utilizado para detectar hipoxia en las estructuras del SNC (Curtis *et al.*, 2009; Sakimoto *et al.*, 2012; Rattner *et al.*, 2013).

6.4. Obtención del tejido cerebral

Los animales se anestesiaron con una dosis de 55 mg/kg de pentobarbital sódico. Posteriormente, se realizó la fijación del tejido mediante perfusión intracardiaca, primero con 100-150 mL de solución de buffer de fosfatos (PBS) 1X con heparina e inmediatamente se perfundieron 100-150 mL de paraformaldehído (PFA) al 4%, ambos a 4°C. Se extrajo el cerebro completo y se realizó una post-fijación con PFA al 4% durante 1 día. El tejido cerebral se conservó en una solución de sacarosa al 30% por un tiempo mínimo de 2 días.

6.5. Inmunofluorescencia

Se realizaron cortes coronales hipocampales de 30 µm de grosor (Bregma -2.40 a -4.20; Paxinos y Watson, 1988) mediante un criostato. Las rebanadas de tejido cerebral fueron conservadas en una solución crioprotectora de PBS 0.01 M (PBS 1X), sacarosa al 30% y etilenglicol al 30%.

La técnica de inmunofluorescencia se realizó con las rebanadas obtenidas de tejido cerebral. Las rebanadas fueron fijadas en portaobjetos electrocargados. Después se delimitó el área de la muestra con plumón hidrofóbico.

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia se utilizó una cámara húmeda, donde se permeabilizó el tejido con PBS 1X y PBS 1X-Tritón 0.4% durante 10 minutos y 15 minutos respectivamente. Las rebanadas se incubaron con una solución de NH₄Cl 50 mM en PBS 1X durante 15 minutos, para disminuir la autofluorescencia. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 1 a 5 min con PBS para proceder con el bloqueo de unión inespecífica con una solución de suero normal de burro (SNB) al 5%/ albúmina sérica bovina (BSA) al 0.2%/ Tritón 0.4% en PBS 1º por 2 horas a temperatura ambiente.

Después, se incubaron los anticuerpos primarios correspondientes (tabla 2) con solución de bloqueo de unión inespecífica durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 10 lavados de 1 a 5 minutos con PBS 1X y, posteriormente, se procedió a incubar con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 10 lavados con PBS 1X, enseguida se agregó DAPI (2µL/mL) por 5 minutos para marcar los núcleos celulares, lavando 3 veces con PBS 1X durante 1 a 5 minutos. Finalmente, se hicieron dos lavados con agua desionizada de 1 a 5 minutos, se agregó DABCO, se situaron los cubreobjetos y se sellaron las laminillas con barniz transparente.

Tabla 2. Anticuerpos y sustancias.

Anticuerpo:	Generado en:	No. de cat.:	Marca:	Concentración:
Caspasa 3	Conejo	9661	Cell Signaling	1:400
CD31	Rata	559286	BD Pharmingen	1:50
GAD67	Mouse	GTX101881	GENETEX	1:1000
FITC-MAb1	Conejo	9.7.11	<i>Hypoxyprobe</i> TM-1Kit	1:100
VEGF	Conejo	Sc-507	Santa Cruz	1:50
DAPI		D3571	INVITROGEN	1:500
Alexa Flour 488	Cabra anti conejo	A11070	INVITROGEN	1:500
Alexa Flour 488	Cabra anti ratón	A11001	INVITROGEN	1:500
Alexa Flour 594	Cabra anti conejo		INVITROGEN	1:500
Alexa Flour 594	Burro anti rata		INVITROGEN	1:500

Para cada anticuerpo se procesaron en paralelo controles negativos, donde se omitió la incubación con cada uno de los anticuerpos primarios en rebanadas adyacentes para comprobar la especificidad de la inmunotinción.

6.6. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Para realizar la tinción de hematoxilina-eosina se utilizaron las rebanadas de cerebro con las características descritas en el primer párrafo de la sección 6.5. Las rebanadas se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados o electrocargados para posteriormente proceder con la tinción.

Las muestras fueron rehidratadas con etanol al 100%, 95% y al 70%. Enseguida, se colocaron en agua destilada para después ser sumergidas en solución de hematoxilina de Harris durante 10 min. Se lavó con agua destilada y se diferenció con alcohol ácido (400 mL de solución de etanol al 70% más 1 mL de HCl concentrado) durante 10 segundos. Se realizó un lavado con agua corriente y después se procedió a diferenciar con PBS 1X con un pH=8.4. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada y se sumergieron en alcohol al 95% para después ser incubadas en una solución de eosina amarilla al 1% durante 5 min. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Las rebanadas se colocaron en etanol al 70%, 95% y 100% y posteriormente en xileno durante 5 min. Finalmente, a las muestras se les colocaron cubreobjetos sellados con resina, para su posterior visualización en un microscopio óptico.

6.7. Análisis histológico.

Los cortes se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Light Microscopy Germany, 2003) con una magnificación de 10X, donde se visualizaron las marcas preliminares, se delimitó las regiones a analizar y a partir de las mismas, se realizó un análisis cualitativo. Se seleccionaron secciones de GD, CA3 y CA1 y se localizó la inmunopositividad a los aductos de proteínas-*hypoxyprobe*; el patrón de colocación de CD31 y VEGF y expresión de caspasa 3; utilizando un curso temporal post-reperfusión (PRF) a los días 1, 2, 7 y 15*. La obtención de las fotomicrografías digitales fue hecha con el software AxioVision 4.8. (Carl Zeiss Imaging Solutions Germany, 2009).

Los cortes también se observaron en un microscopio Confocal LSM 800 (Carl Zeiss, Light Microscopy Germany) a 10X utilizando el software ZEN 2.3 (blue edition, Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011). Para determinar el valor de la intensidad media de la fluorescencia (IMF) se seleccionó el área de interés con la herramienta ROI (Región de Interés: *Region Of Interest*) del software ZEN 2.3.

La IMF; del FITC (*hypoxyprobe*); de Alexa 488 (VEGF); y de Alexa 594 (CD31) fue determinada de la siguiente manera.

En GD, se seleccionó el *stratum granulosum*, el *stratum moleculare* y la capa polimórfica, ambos, de manera completa, para un perfil de línea (figura 8a) de 638.90 μm ; En CA3, se seleccionó parte del *stratum lucidum*, *stratum pyramidale* y *stratum oriens* para un perfil de línea (cuadro rojo, figura 8b) de 250.1472 μm y para la región CA1, se seleccionó parte del *stratum oriens*, *stratum pyramidale* y *stratum radiatum* para un perfil de línea (cuadro rojo, figura 8c) de 224.5621 μm .

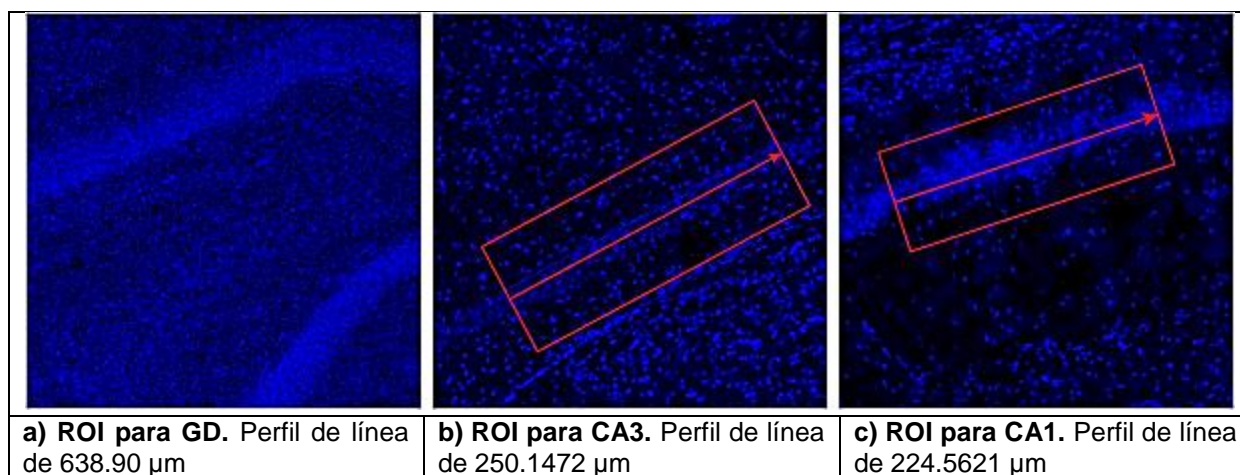


Fig. 8. ROI's seleccionados para las regiones del hipocampo.

Los parámetros de adquisición fueron los siguientes:

1. Para el FITC (*hypoxyprobe*):
 - Pinhole: 28 μm
 - Longitud de onda (nm) e intensidad de láser (%): 488 nm, 0.95%
 - Detector: LSM800 Airyscan
 - Ganancia: 873 V
 - Ganancia digital: 1

2. Para el Alexa 488 (VEGF):
 - Pinhole: 34 μm
 - Longitud de onda (nm) e intensidad de láser (%): 488 nm, 1.20%
 - Detector: LSM800 Airyscan
 - Ganancia: 895 V
 - Ganancia digital: 1
3. Para el Alexa 594 (CD31):
 - Pinhole: 29 μm
 - Longitud de onda (nm) e intensidad de láser (%): 561 nm, 0.90%
 - Detector: LSM800 Airyscan
 - Ganancia: 937 V
 - Ganancia digital: 1

La IMF de Alexa 594 (Caspasa 3) fue determinada de la siguiente manera:

- Para el GD, se seleccionó parte del *stratum granulosum* para un perfil de línea (cuadro rojo, figura 9a) de 135.0035 μm ; para CA3, se seleccionó parte del *stratum pyramidale* para un perfil de línea (cuadro rojo, figura 9b) de 250.16 μm . Para la región CA1, se seleccionó parte del *stratum pyramidale* para un perfil de línea (cuadro rojo, figura 9c) de 224.4906 μm .

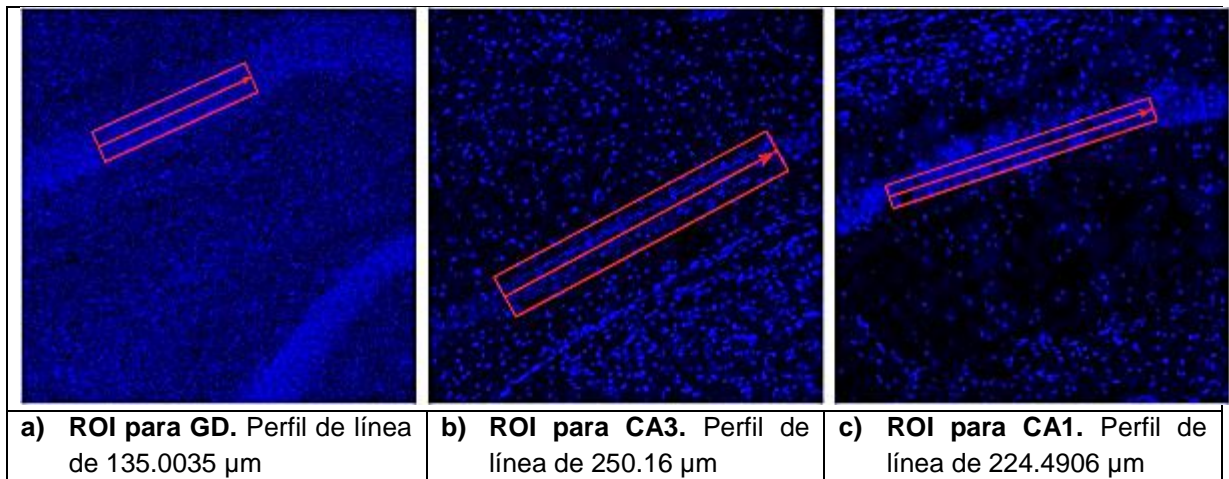


Fig. 9. ROI's seleccionados para los *sp* y *sg* en las regiones del hipocampo.

Utilizando los parámetros de adquisición:

- Pinhole: 40 μm
- Longitud de onda (nm) e intensidad de láser (%): 561 nm, 0.55%
- Detector: LSM800 Airyscan

- Ganancia: 882 V
- Ganancia digital: 1

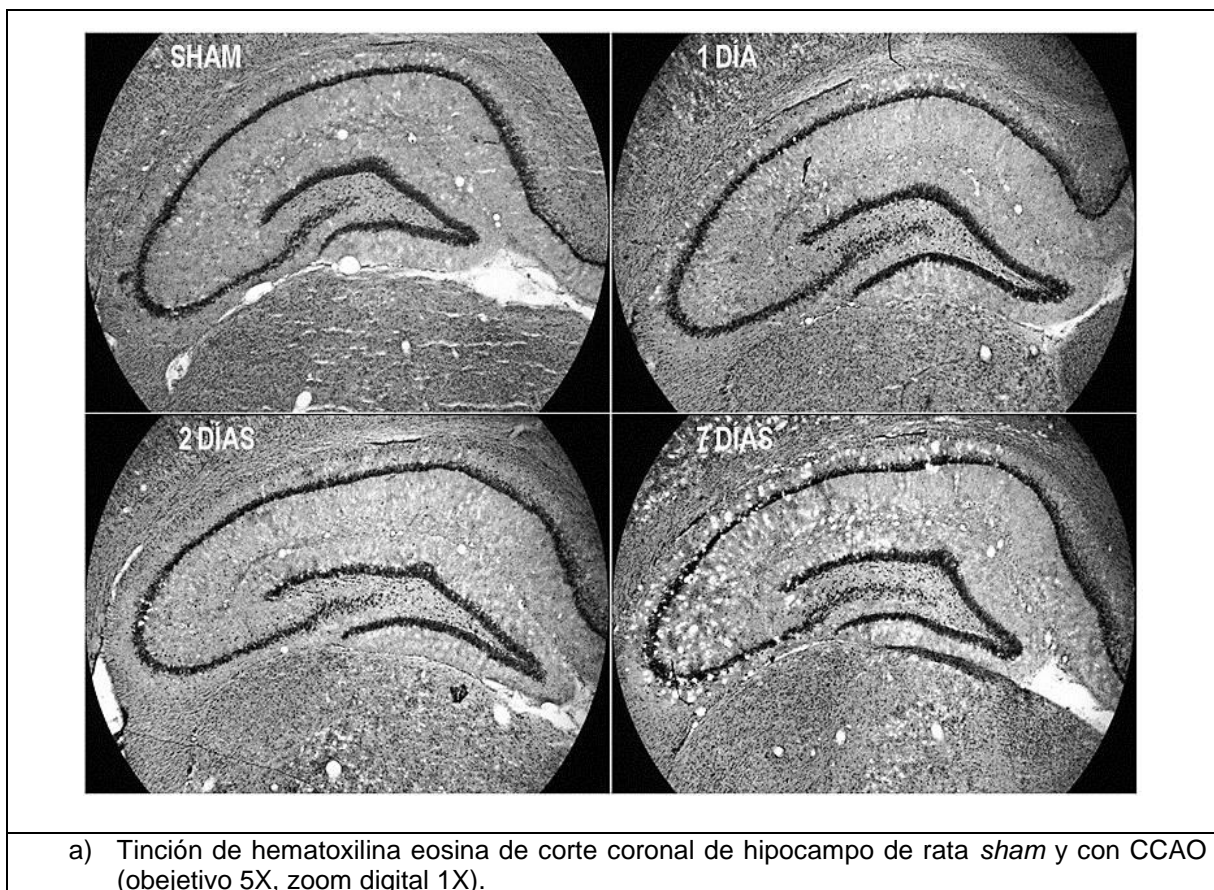
6.8. Análisis estadístico

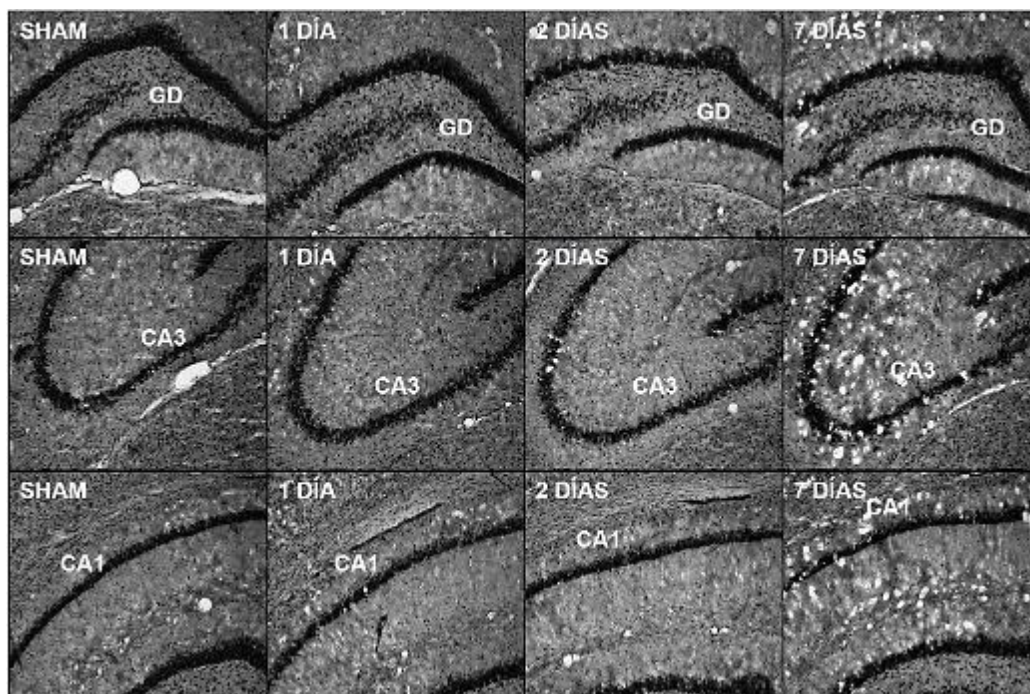
Los datos se presentan como el valor de la media \pm el error estándar (ES). La significancia estadística se determinó por análisis de la varianza (ANOVA), de una vía, de medidas repetidas, seguido de la prueba de Dunnett. Se consideró como estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Cambios conformacionales en el hipocampo tras la CCAO

La tinción con hematoxilina-eosina nos permite determinar cualitativamente, el nivel de daño tras la CCAO. Como se aprecia en las figuras 10 y 11, el daño histológico en la formación hipocampal fue visible a partir del día 7 PRF. Este daño se caracterizó por la presencia de vacuolas, espacios vacíos y núcleos celulares reducidos además de una desorganización en la densidad neuronal en el *stratum pyramidale* de CA3 y CA1. Sin embargo, los cambios estructurales fueron evidentes en la región CA1 desde el día 1 PRF y se agudizaron al día 7 PRF. En CA3, las alteraciones se expresaron a partir del día 2 PRF como una desorganización de la densidad neuronal y se agudizaron al día 7 PRF. Para el GD, los cambios en estructura fueron evidentes en el día 7 PRF.





b) Tinción de hematoxilina eosina de corte coronal de hipocampo de rata sham y con CCAO (objetivo 5X, zoom digital 2.8X).

Fig. 10. Tinción hematoxilina y eosina mostrando el curso temporal del desarreglo estructural del hipocampo tras el daño isquémico en cerebro. Cortes coronales hipocámpales de cerebro de rata *sham* y con CCAO (10 minutos) obtenidos a diferentes días PRF (1, 2, y 7 días). Las muestras se procesaron por microscopía de campo claro (objetivo 5X; zoom digital 1X y 2.8X; n=3).

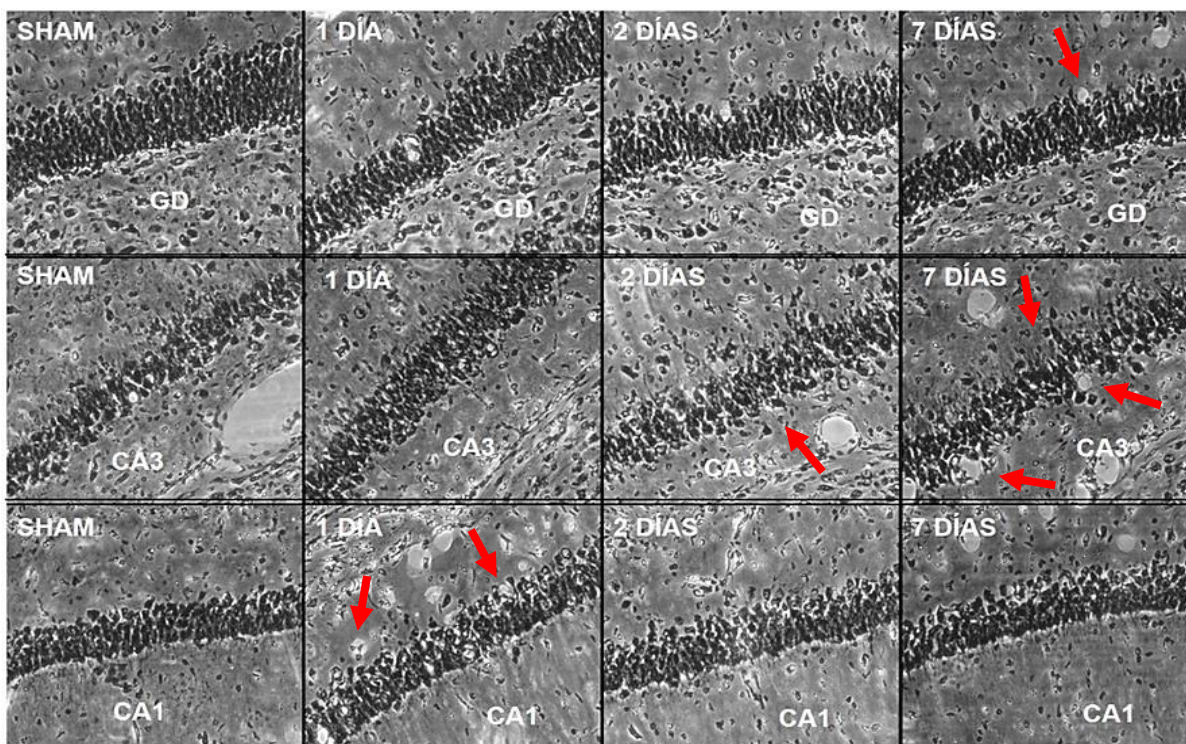


Fig. 11. Curso temporal del desarreglo estructural del hipocampo tras el daño isquémico en cerebro. Cortes coroneales hipocámpales de cerebro de ratas *sham* y con CCAO (10 minutos) obtenidos a diferentes días PRF (1, 2, y 7 días) donde se pueden observar vacuolas, espacios vacíos y núcleos celulares y una desorganización en la densidad neuronal (flechas rojas). Las muestras se procesaron por microscopía de campo claro (objetivo 20X; n=3).

7.2. Detección de hipoxia y daño oxidativo en el hipocampo

Para determinar la oxidación de proteínas en el hipocampo de ratas *sham* y con CCAO, se detectaron y cuantificaron los aductos de proteínas formadas con el *hypoxyprome* a través de microscopía de fluorescencia y se obtuvieron fotomicrografías para cada región (GD, CA3 y CA1) a los días 1, 2 y 7 PRF.

7.2.1. Giro Dentado

En el GD se observó que en ratas con CCAO la Intensidad Media de la Fluorescencia (IMF) del *hypoxyprome* (FITC) incrementó al día 1 PRF y mostró una tendencia a disminuir al día 7 PRF con respecto a las ratas *sham* (IMF del FITC PRF

con respecto al grupo *sham*; al día 1 = $204 \pm 20\%$; $p < 0.05$; al día 7 = $172 \pm 17\%$; $p < 0.05$; $n=3$; figuras 12 y 13). Este resultado indica la presencia de hipoxia y estrés oxidativo en las proteínas estructurales en todo el GD.

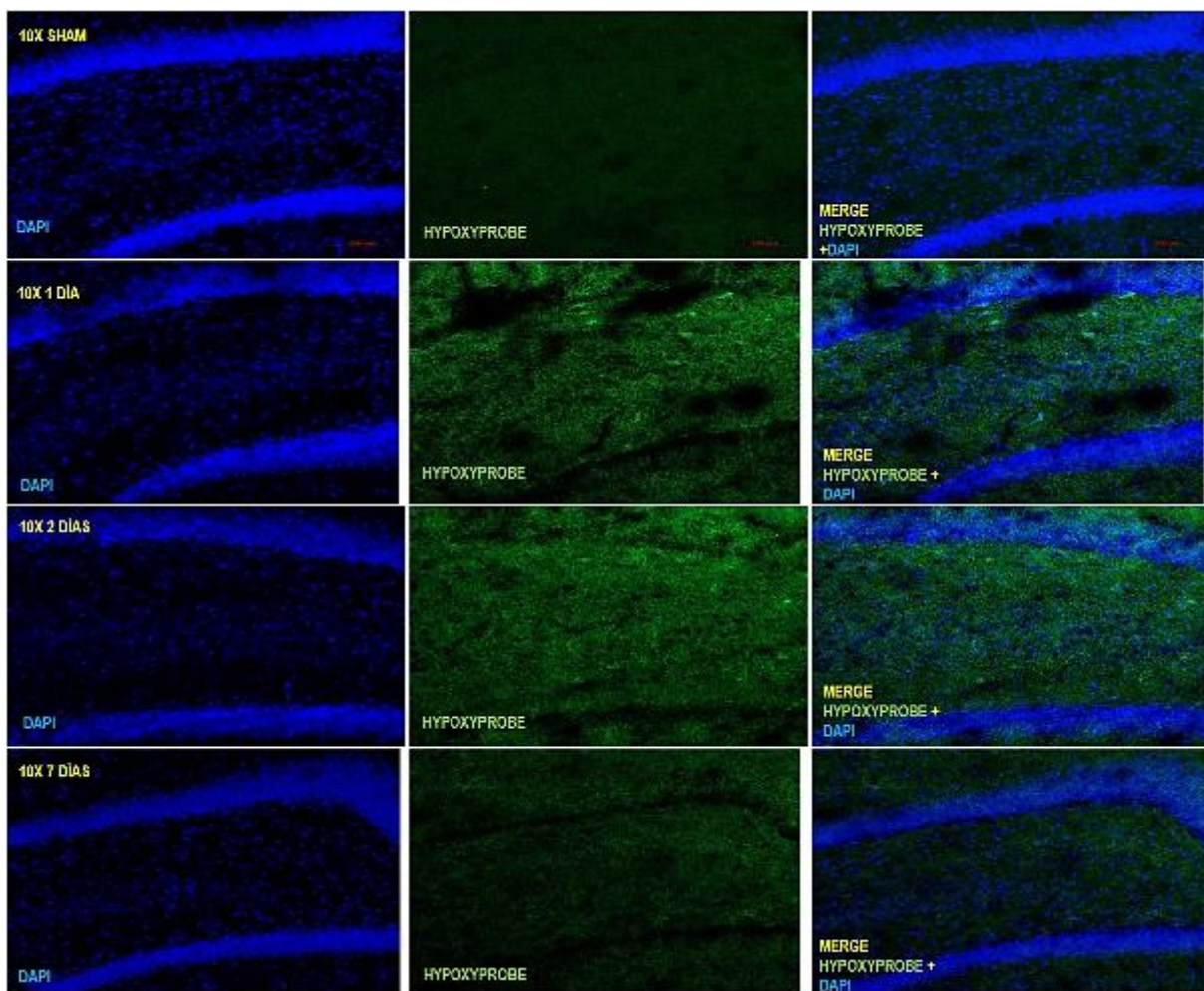


Fig. 12. Curso temporal del estrés oxidante a las proteínas generado por la isquemia en GD. Cortes coronales cerebrales de ratas *sham* y con CCAO (10 min a los días PRF 1, 2 y 7). Las rebanadas se incubaron con un anticuerpo FITC-Mab (verde) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar FITC (hypoxyprome/proteínas oxidadas) por microscopía confocal (objetivo 10X; $n = 3$).

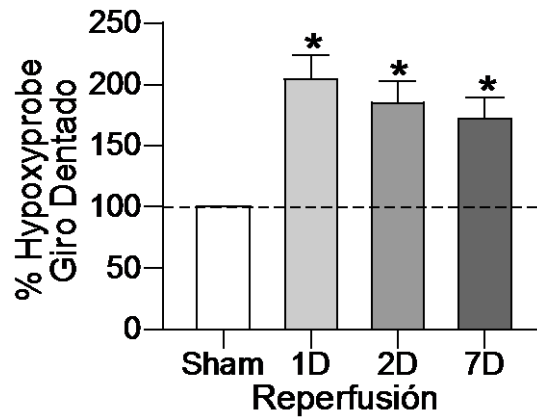


Fig. 13. Detección de hipoxia y estrés oxidativo en el GD. Cuantificación de la IMF del *hypoxyprobe* en el GD. Los datos están normalizados contra los valores obtenidos en los animales *sham*. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. N=3, * = $p < 0.05$.

7.2.2. Región CA3

En la región CA3 se observó que en ratas con CCAO la IMF del *hypoxyprobe* (oxidación de proteínas) incrementó de manera significativa desde día 1 PRF y se mantuvo hasta el día 7 PRF con respecto a las ratas *sham* (IMF del FITC PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1= $330 \pm 18\%$; $p < 0.001$; al día 7= 263 ± 15 ; $p < 0.001$; $n=3$; figuras 14 y 15). Al igual que lo observado en el GD, estos resultados reflejan la presencia de hipoxia y estrés oxidativo en CA3.

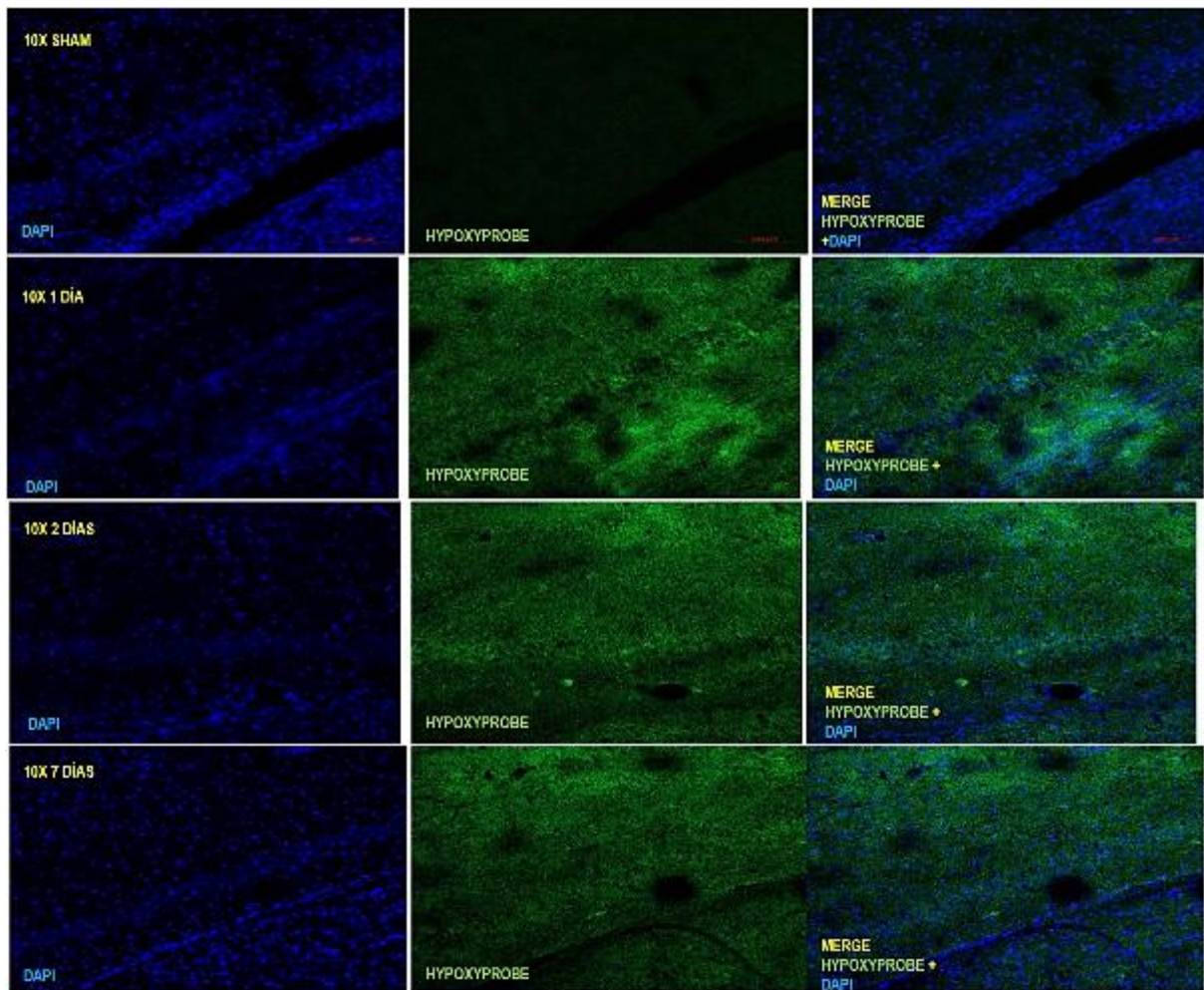


Fig. 14. Curso temporal del estrés oxidante a las proteínas generado por la isquemia en CA3. Cortes coronales cerebrales de *ratas* sham y con CCAO (10 minutos a los días PRF 1, 2 y 7). Se incubaron con un anticuerpo FITC-Mab (verde) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar FITC (objetivo 10X; n = 3).

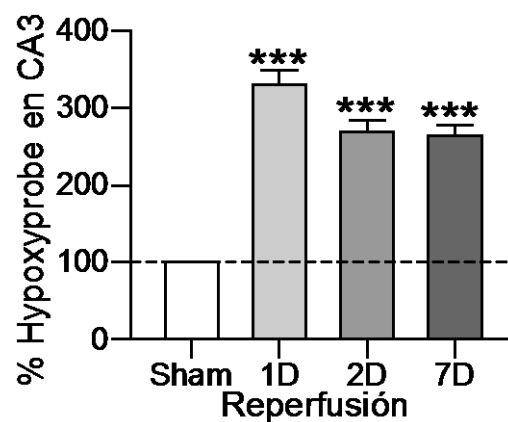


Fig. 15. Detección de hipoxia y estrés oxidativo en la región CA3. Cuantificación de la IMF del *hypoxyprobe* en la región CA3 del hipocampo. Los datos están normalizados contra los valores

obtenidos en los animales *sham*. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. $n=3$, *** = $p<0.001$.

7.2.3. Región CA1

En la región CA1 se observó que en ratas con CCAO la IMF del *hypoxyprobe* (oxidación de proteínas) incrementó desde el día 1 PRF y continuó hasta el día 7 PRF respecto a ratas *sham* (IMF del FITC PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1= $210\pm13\%$; $p<0.05$; al día 7= 180 ± 12 ; $p<0.05$; $n=3$; figuras 16 y 17).

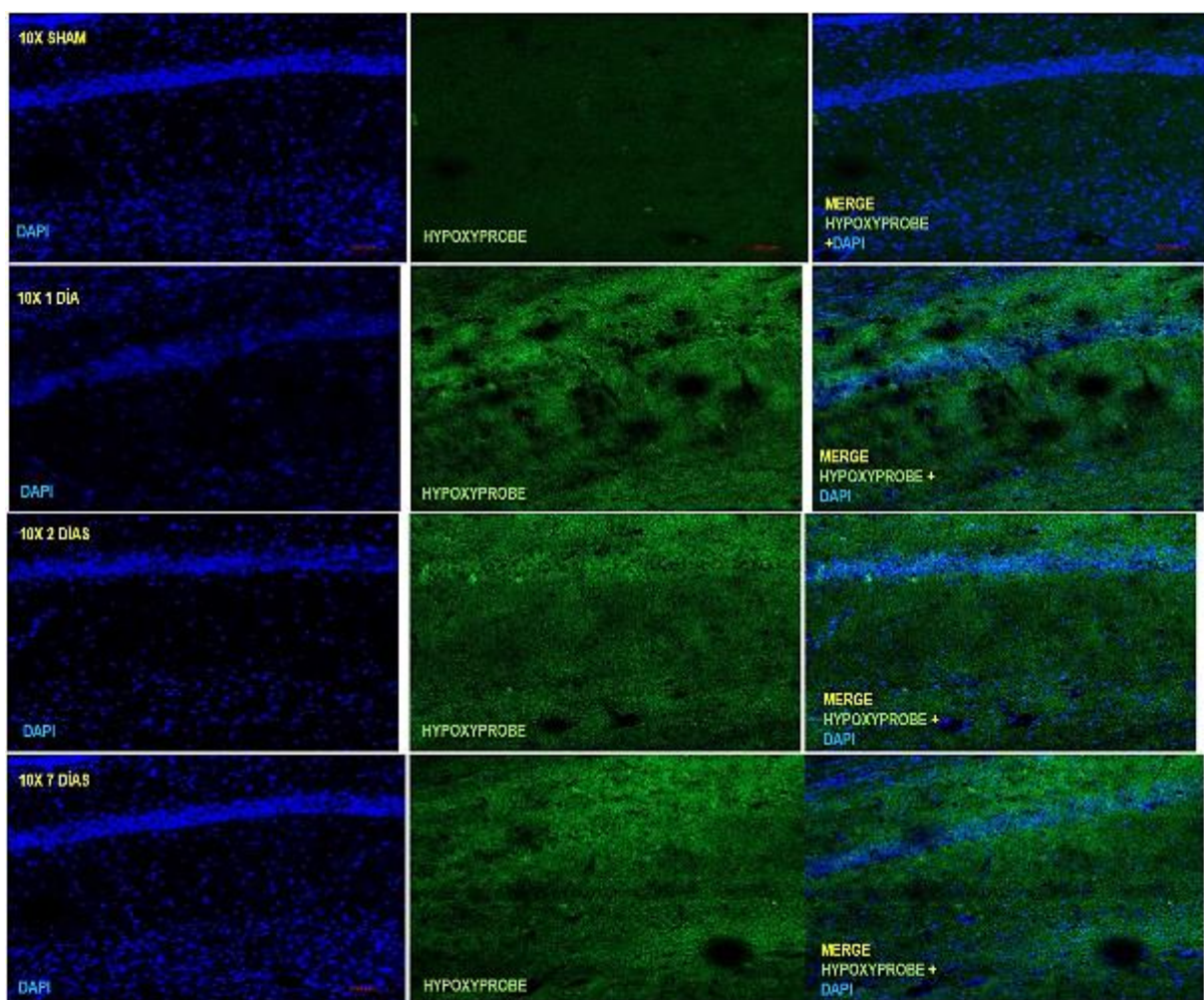


Fig. 16. Curso temporal del estrés oxidante a las proteínas generado por la isquemia en la región CA1. Cortes coronales cerebrales de ratas *sham* y con CCAO (10 minutos a los días PRF 1, 2 y 7). Se incubaron con un anticuerpo FITC-Mab (verde) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar FITC (objetivo 10X; $n = 3$).

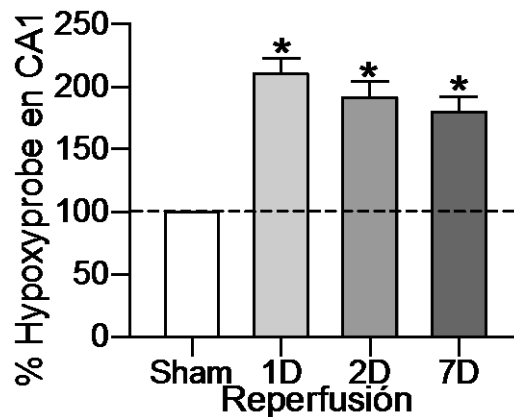


Figura 17. Detección de hipoxia y estrés oxidativo en la región CA1 del hipocampo. Gráfica de barras mostrando la cuantificación de IMF del *hypoxyprobe* en la región CA1 del hipocampo. Los datos están normalizados contra los valores obtenidos en los animales *sham*. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. $n=3$, * = $p<0.05$.

7.3. Efecto de la hipoxia en la expresión de VEGF y de CD31 en el hipocampo

7.3.1. Giro Dentado

La CCAO indujo un aumento en la expresión de VEGF y de CD31 en el GD. Este efecto se observó desde el día 1 PRF y se mantuvo por 15 días. La IMF del fluoróforo Alexa 488 utilizando para detectar VEGF se incrementó de manera significativa el día 1 y 2 PRF y no se observó un aumento significativo a los 7 días PRF (IMF de Alexa 488 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1 = $165\pm 8\%$; $p<0.05$; al día 2 = 165 ± 9 ; $p<0.05$, al día 7 = $132\pm 8\%$; $n=3$; figuras 18 y 19). Sin embargo al día 15 PRF, la señal de VEGF se incrementó casi al doble del nivel basal ($188\pm 10\%$; $p<0.05$). VEGF se expresa en todas las capas del GD.

En cuanto al fluoróforo Alexa 594 utilizado para detectar CD31, la IMF incrementó a partir del día 1 PRF y continuó en niveles elevados al día 2 y 7 PRF (IMF de Alexa 594 PRF con respecto al Sham al día 1 = 223 ± 12 ; $p<0.001$; al día 2 = 242 ± 15 ; $p<0.001$; al día 7 = 220 ± 13 ; $p<0.001$; $n=3$; Figura 18 y 19). Sin embargo al día 15 PRF, la señal de CD31 se incrementa casi al triple del nivel basal ($382\pm 20\%$; $p<0.001$; $n=3$). Estos resultados sugieren que a los 15 días PRF al aumentar de manera importante la

expresión de VEGF y de CD31 es posible que exista una mayor formación de capilares y pequeños vasos sanguíneos a este tiempo.

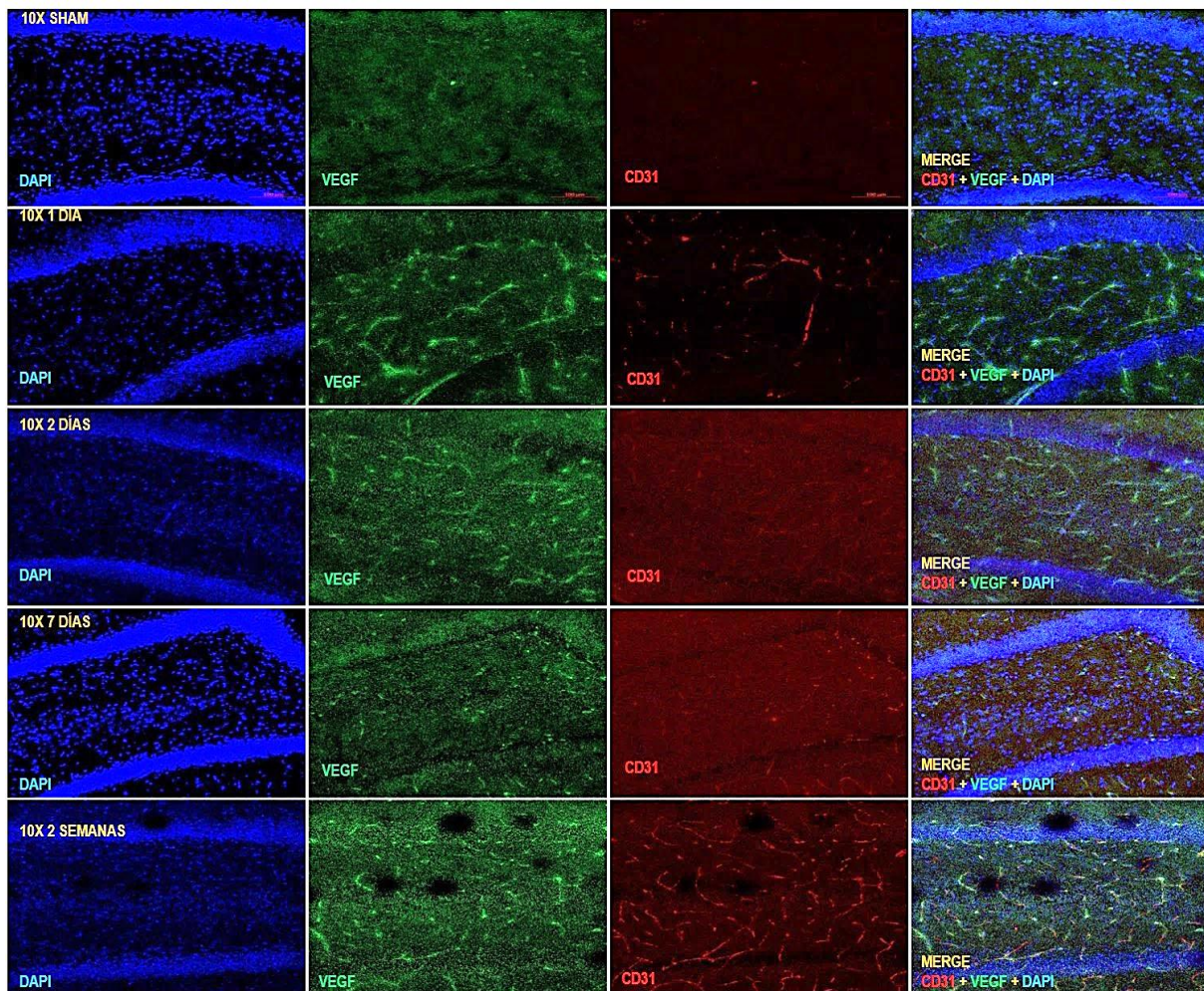


Fig. 18. Expresión temporal de CD31 y VEGF como respuesta al daño isquémico en giro dentado. Cortes coronales cerebrales de ratas *sham* y con CCAO (10 minutos a los días PRF 1, 2, 7 y 15). Las rebanadas se incubaron con un anticuerpo anti CD31 (rojo), anti VEGF (verde) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar Alexa 594 y 488 (CD31/VEGF) por microscopía confocal (con objetivo 10X; n = 3).

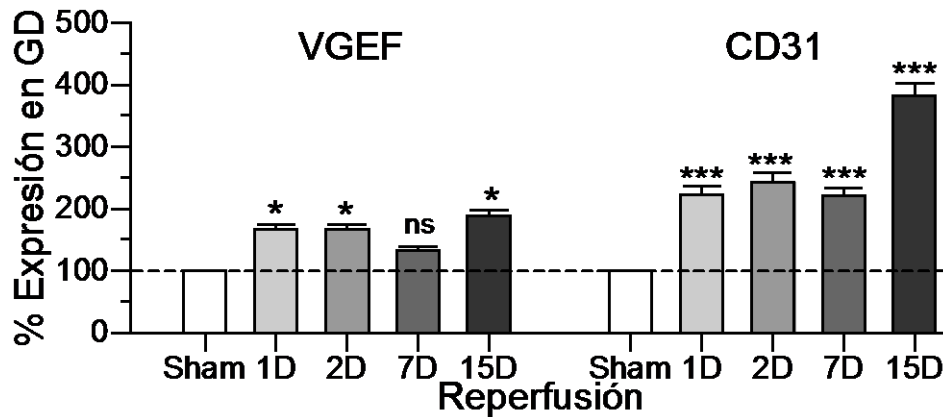


Figura 19. La isquemia induce el aumento en la expresión de VEGF y CD31 en el GD. Gráfica de barras normalizada que muestra la cuantificación de la IMF de VEGF y de CD31. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. $n=3$, ns = no significativo; $*$ = $p<0.05$; $***$ = $p<0.001$.

7.3.2. Región CA3

La CCAO indujo un aumento en la expresión de VEGF y de CD31 en la región CA3. Este efecto se observó desde el día 1 PRF y se mantuvo por 15 días. La IMF de Alexa 488 se incrementó de manera significativa el día 1 y 2 PRF y no se observó un aumento significativo a los 7 días PRF (IMF de Alexa 488 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1= 157 ± 10 ; $p<0.05$; al día 2= 166 ± 11 ; $p<0.05$; al día 7= 136 ± 10 ; $n=3$; figuras 20 y 21). Sin embargo al día 15 PRF, la señal de VEGF incrementó significativamente comparado con las ratas *sham* ($193\pm13\%$; $p<0.05$; $n=3$).

En cuanto a CD31, la IMF de Alexa 594 incrementó a partir del día 1 PRF y se mantuvo hasta el día 7 PRF (IMF de Alexa 594 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1= $204\pm11\%$; $p<0.05$; al día 2= 227 ± 13 ; $p<0.05$; al día 7= 212 ± 13 ; $p<0.05$; $n=3$; figuras 20 y 21). En contraste, al día 15 PRF, la señal de CD31 incrementó casi al triple del nivel basal ($384\pm22\%$; $p<0.05$; $n=3$). Estos resultados sugieren que a los 15 días PRF al aumentar de manera importante la expresión de VEGF y de CD31 es posible que exista una mayor formación de capilares y pequeños vasos sanguíneos a este tiempo, que parece menor que en el GD y región CA1.

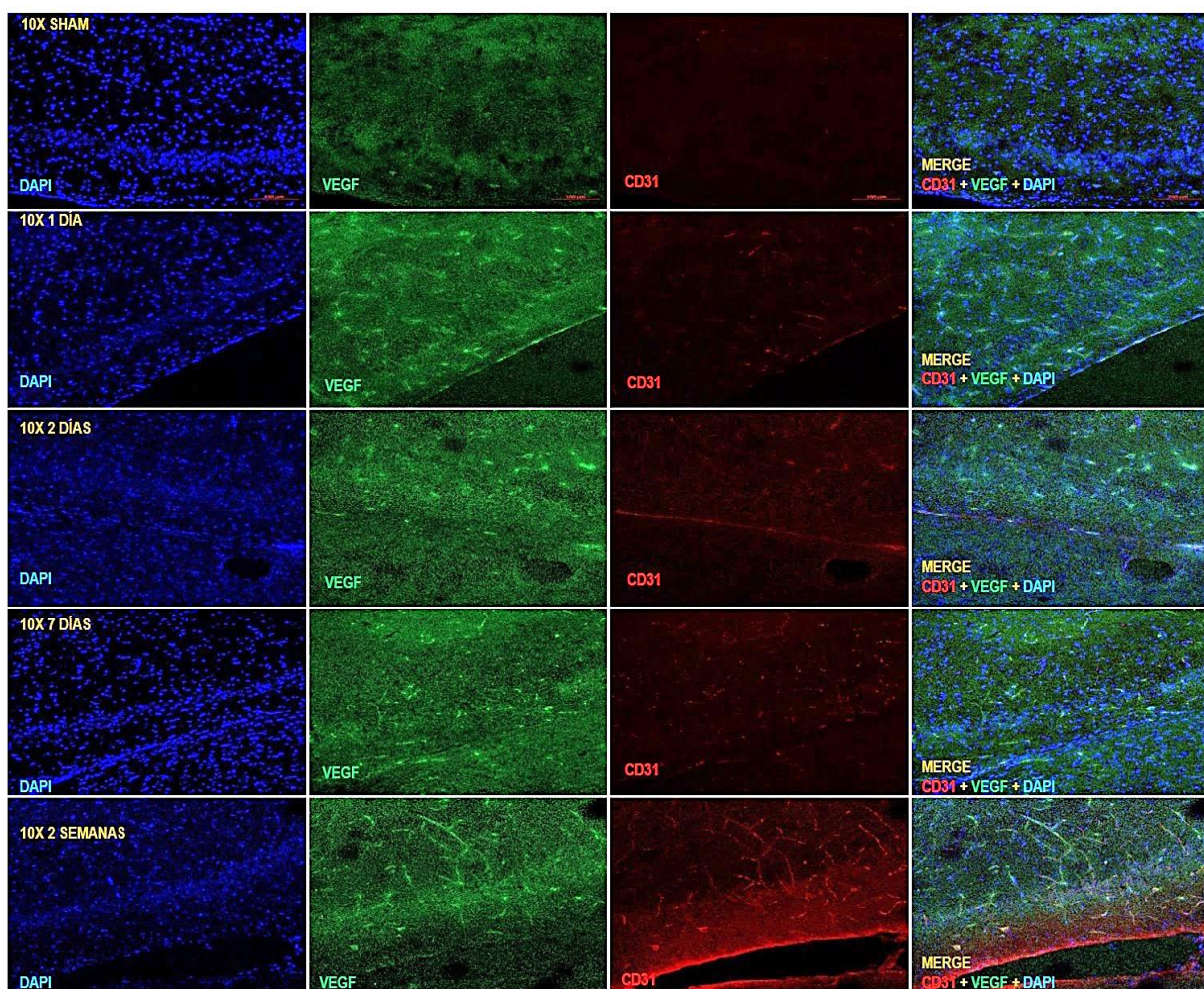


Fig. 20. Curso temporal de la expresión de CD31 y VEGF como respuesta al daño isquémico en la región CA3 del hipocampo. Cortes coronales cerebrales de ratas *sham* y con CCAO (10 minutos a los días PRF 1, 2, 7 y 15). Las rebanadas se incubaron en presencia de un anticuerpo anti CD31 (rojo), anti VEGF (verde) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar Alexa 594 y 488 (CD31/VEGF) por microscopía de fluorescencia (con objetivo 10X; n = 3).

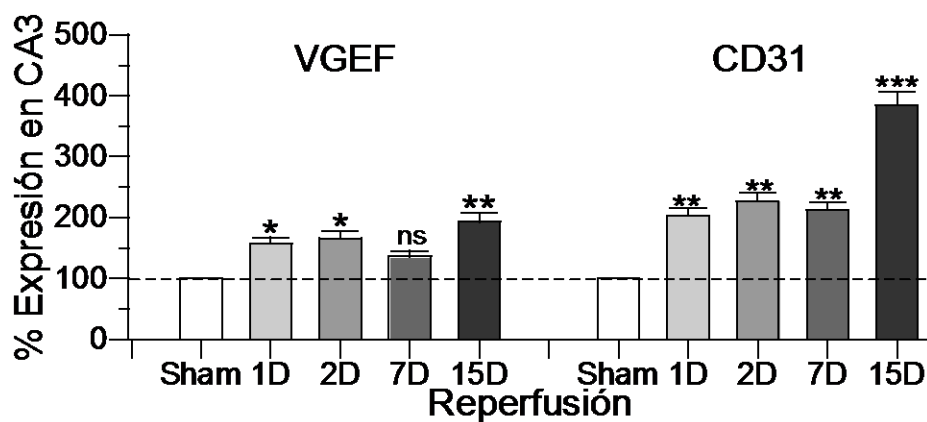


Fig. 21. La isquemia induce el aumento en la expresión de VEGF y CD31 en CA3. Gráfica de barras normalizada mostrando la cuantificación de la IMF de VEGF y de CD31 en la región CA3. Los valores

de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. n=3, ns= no significativo; * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$.

7.3.3. Región CA1

La IMF de VEGF incrementó de manera significativa desde los días 1, 2 y 7 PRF (IMF de VEGF PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1 = $134 \pm 8\%$; $p < 0.05$; al día 2 = 143 ± 8 ; $p < 0.05$; al día 7 = 133 ± 7 ; $p < 0.05$; n=3; figuras 22 y 23). En contraste, al día 15 PRF, la señal de VEGF incrementó casi al doble del nivel basal a lo largo de la región CA1 ($184 \pm 10\%$; $p < 0.05$; n=3).

En cuanto a CD31, el patrón de fluorescencia tuvo el siguiente perfil: (IMF de CD31 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1 = $217 \pm 14\%$; $p < 0.001$; al día 2 = 256 ± 19 ; $p < 0.001$; al día 7 = 231 ± 18 ; $p < 0.001$; n=3; figura 22 y 23). Al día 15 la señal de CD31 experimentó un aumento de casi el triple a lo observado en condición basal ($352 \pm 24\%$; $p < 0.001$).

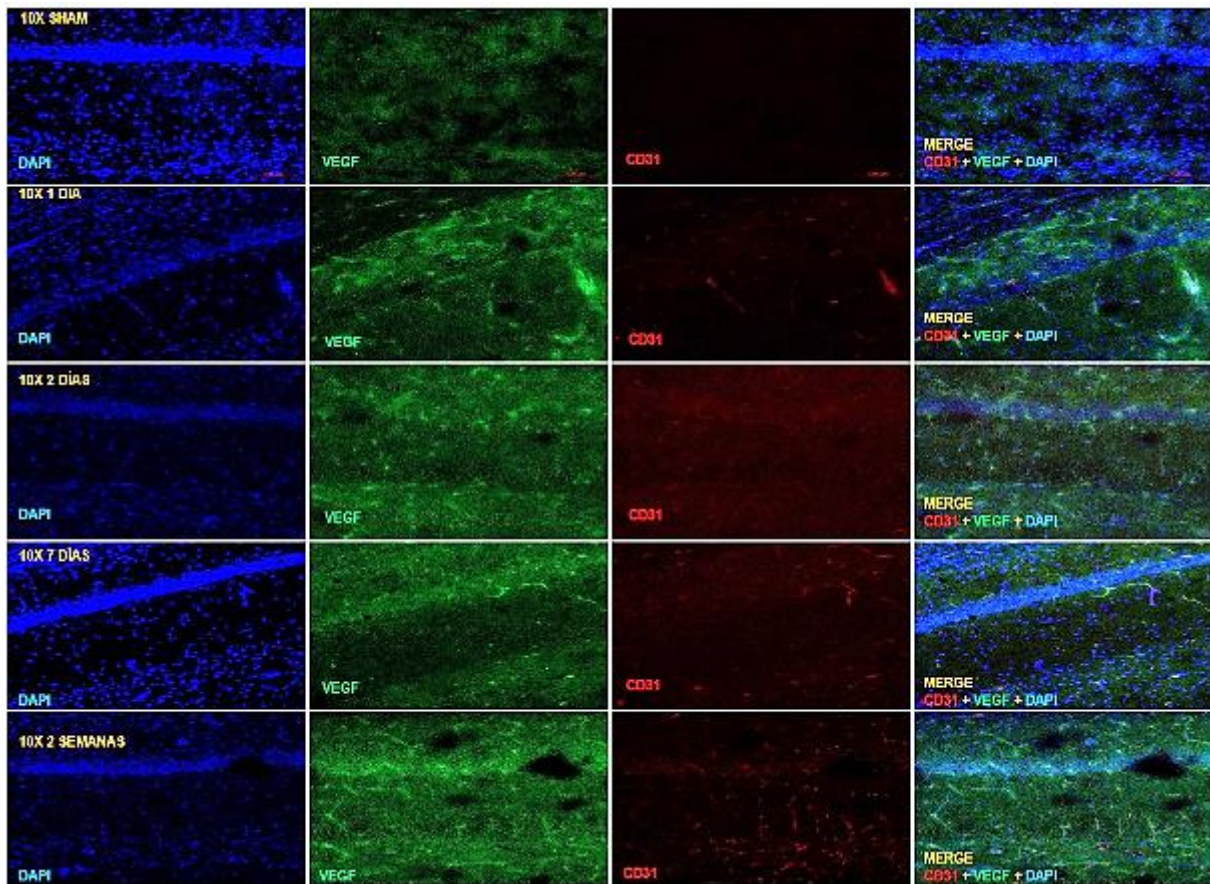


Fig. 22. Curso temporal de la expresión de CD31 y VEGF como respuesta al daño isquémico en la región CA1. Cortes coronales cerebrales de ratas *sham* y con CCAO (10 minutos a los días PRF 1, 2, 7 y 15). Las rebanadas se incubaron en presencia de un anticuerpo anti CD31 (rojo), anti VEGF (verde) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar Alexa 594 y 488 (CD31/VEGF) por microscopía confocal (con objetivo 10X; n=3).

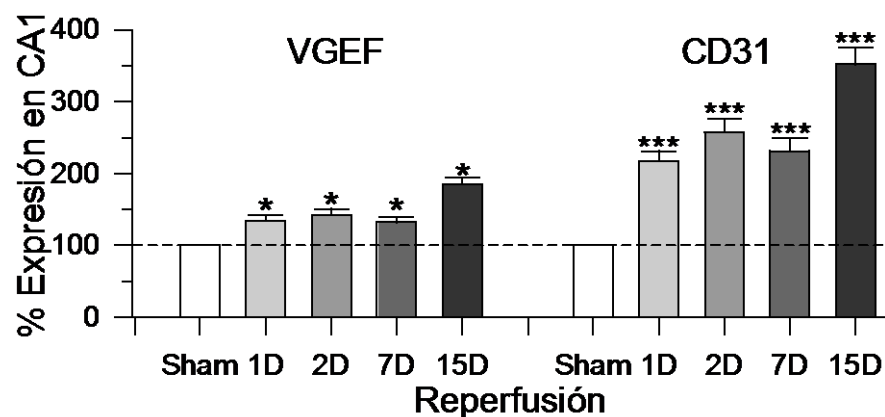


Fig. 23. La isquemia induce el aumento en la expresión de VEGF y CD31 en la región CA1 del hipocampo. Gráfica de barras normalizada mostrando la cuantificación de la IMF de VEGF en la región CA1. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. n=3, * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$.

7.4. Efecto de la isquemia sobre la activación de la Caspasa-3

7.4.1. Giro Dentado

La CCAO indujo un aumento progresivo en la expresión de la caspasa-3, el cual se observó a partir del día 2 al 7 PRF respecto a ratas *sham* (IMF de Alexa 595 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 2= $178 \pm 10\%$; $p < 0.001$; al día 7= $276 \pm 16\%$; $p < 0.001$; $n=3$; figuras 24 y 25).

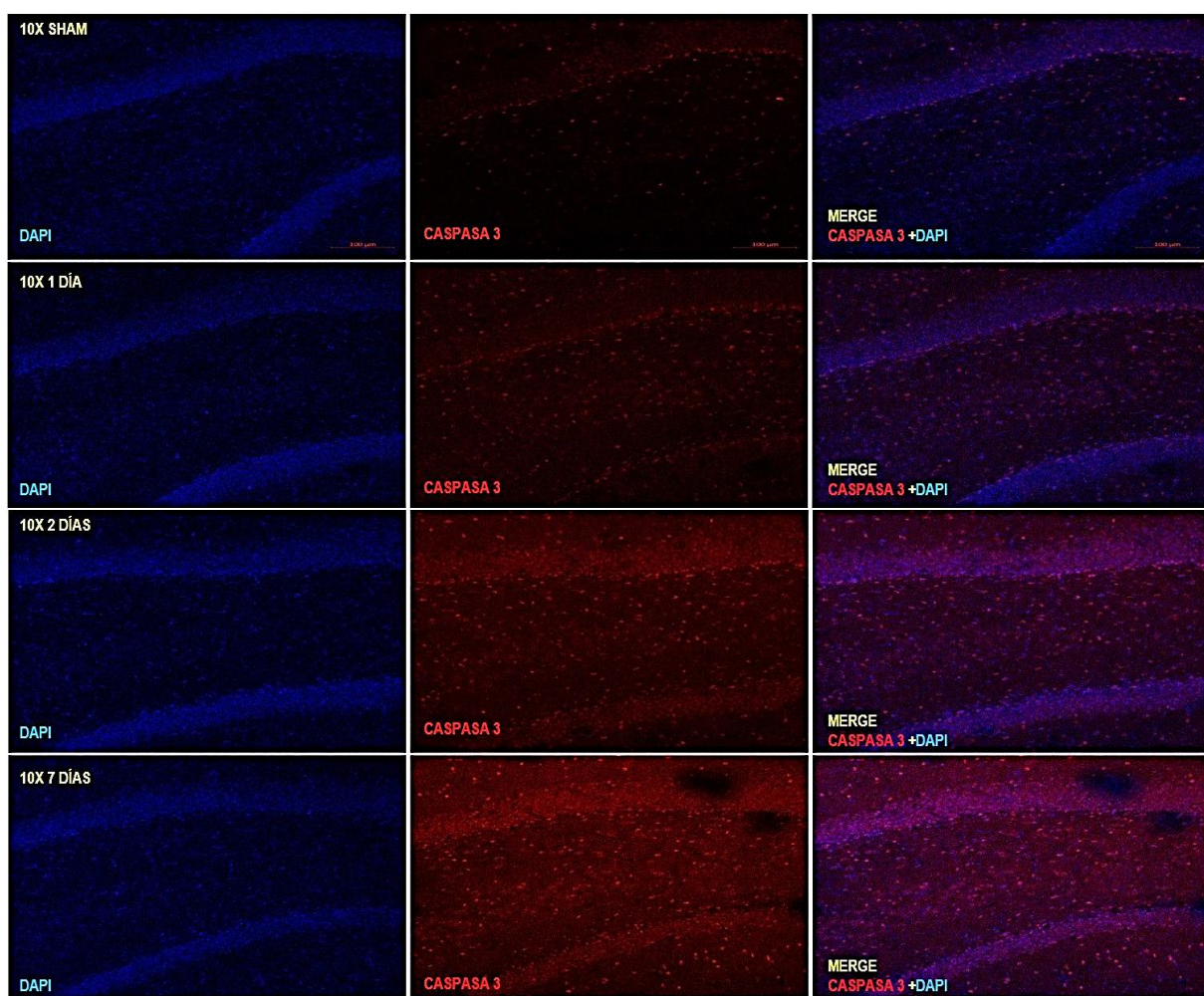


Fig. 24. Curso temporal de la expresión de caspasa 3 en el GD. Cortes coronales cerebrales de ratas *sham* y con CCAO (10 minutos a los días PRF 1, 2 y 7). Las rebanadas se incubaron con un anticuerpo anti caspasa-3 (rojo) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar Alexa 594 (objetivo 10X; $n=3$).

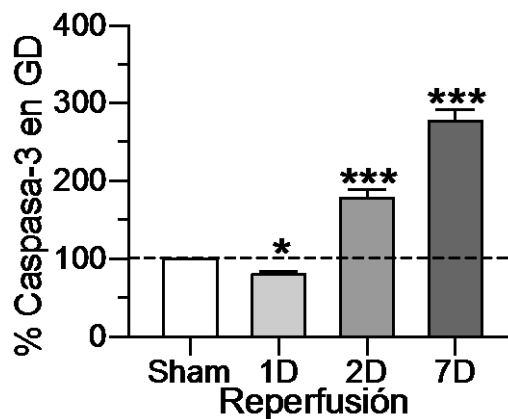


Fig. 25. La isquemia incrementa la expresión de la caspasa-3 en el Giro Dentado. Gráfica de barras normalizada. IMF de Caspasa-3. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. $n=3$, $*$ = $p<0.05$; $***$ = $p<0.001$.

7.4.2. Región CA3

En el *stratum pyramidale* de CA3, la IMF de caspasa-3 incrementó de manera transitoria al día 2 PRF ($126\pm5\%$; $p<0.001$; $n=3$). Sin embargo, su expresión desapareció al día 7 (IMF de Alexa 594 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 1 = 77 ± 3 ; $p<0.001$; al día 7 = 0.5 ± 0.03 ; $p<0.001$; $n=3$; figuras 26 y 27). Por lo tanto, la CCOA induce activación transitoria de caspasa-3 en la región CA3.

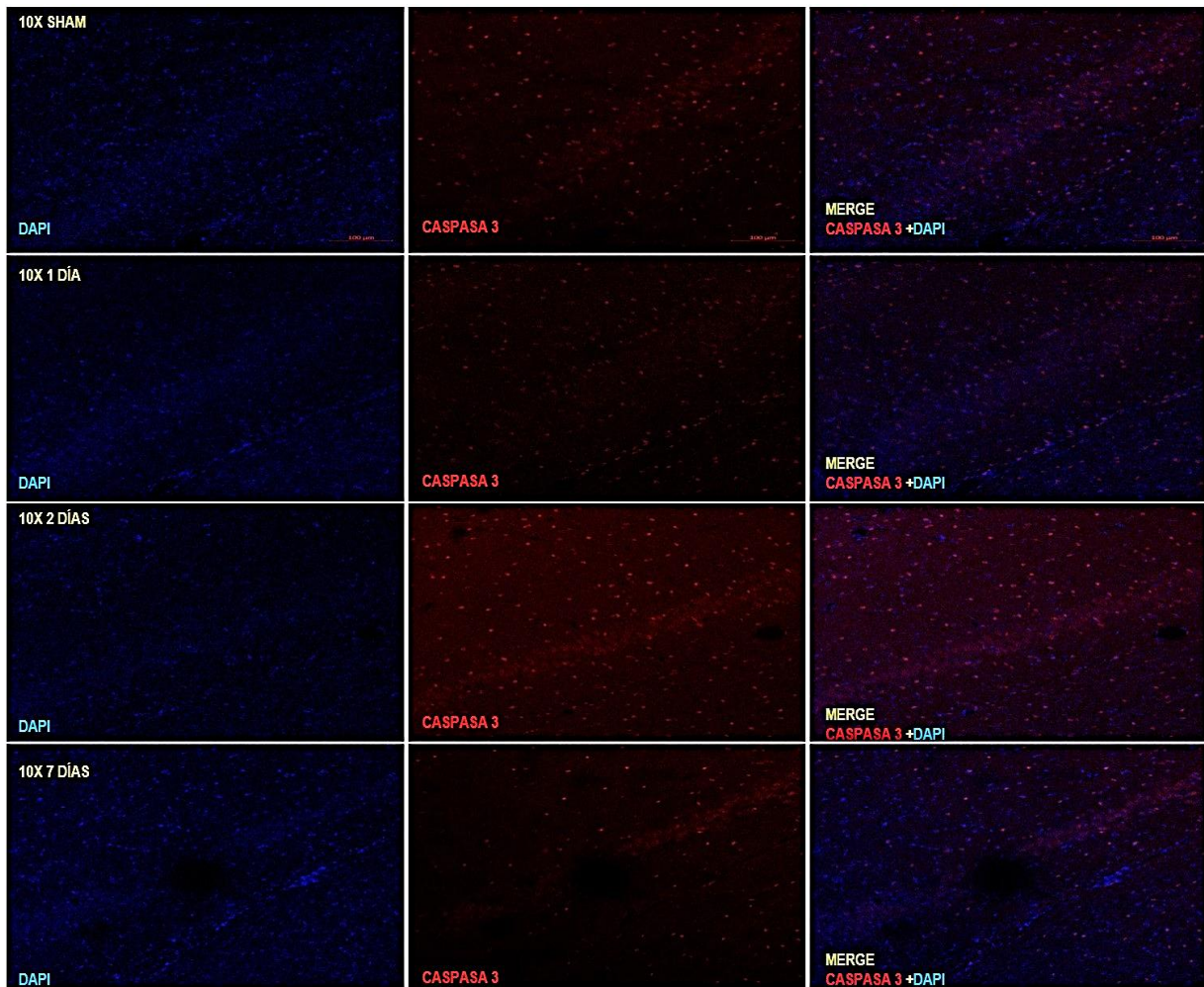


Fig. 26. Curso temporal de la expresión de caspasa 3 como marcador de apoptosis tras el daño isquémico en cerebro. Cortes coronales. Las rebanadas se incubaron en presencia de un anticuerpo anti caspasa3 (rojo) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar Alexa 594 (caspasa-3) por microscopía confocal (objetivo 10X; n=3).

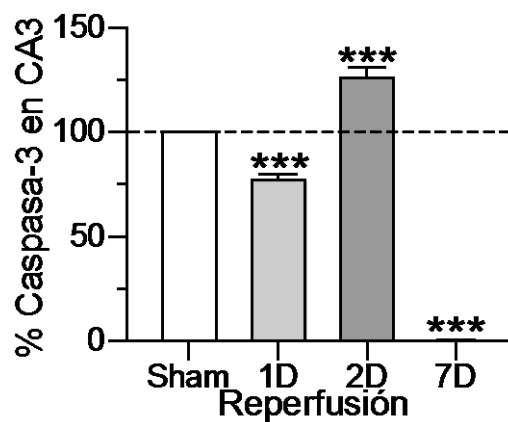


Fig. 27. La isquemia incrementa la expresión de la caspasa 3 en CA3. Gráfica de barras normalizada mostrando la cuantificación de la IMF de caspasa-3 en la región CA3. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. n=3, ***= p<0.001.

7.4.3. Región CA1

Por último, la IMF de la caspasa 3 aumentó su expresión en todos los días analizados de la región CA1 del hipocampo (IMF de caspasa-3 PRF con respecto al grupo *sham*; al día 2= $167\pm 7\%$; $p<0.05$; al día 7= 306 ± 15 ; $p<0.05$; $n=3$; figuras 28 y 29). Este resultado está en concordancia con lo reportado en la literatura, que ha mostrado de manera consistente que la región CA1 del hipocampo es altamente sensible al daño inducido por isquemia.

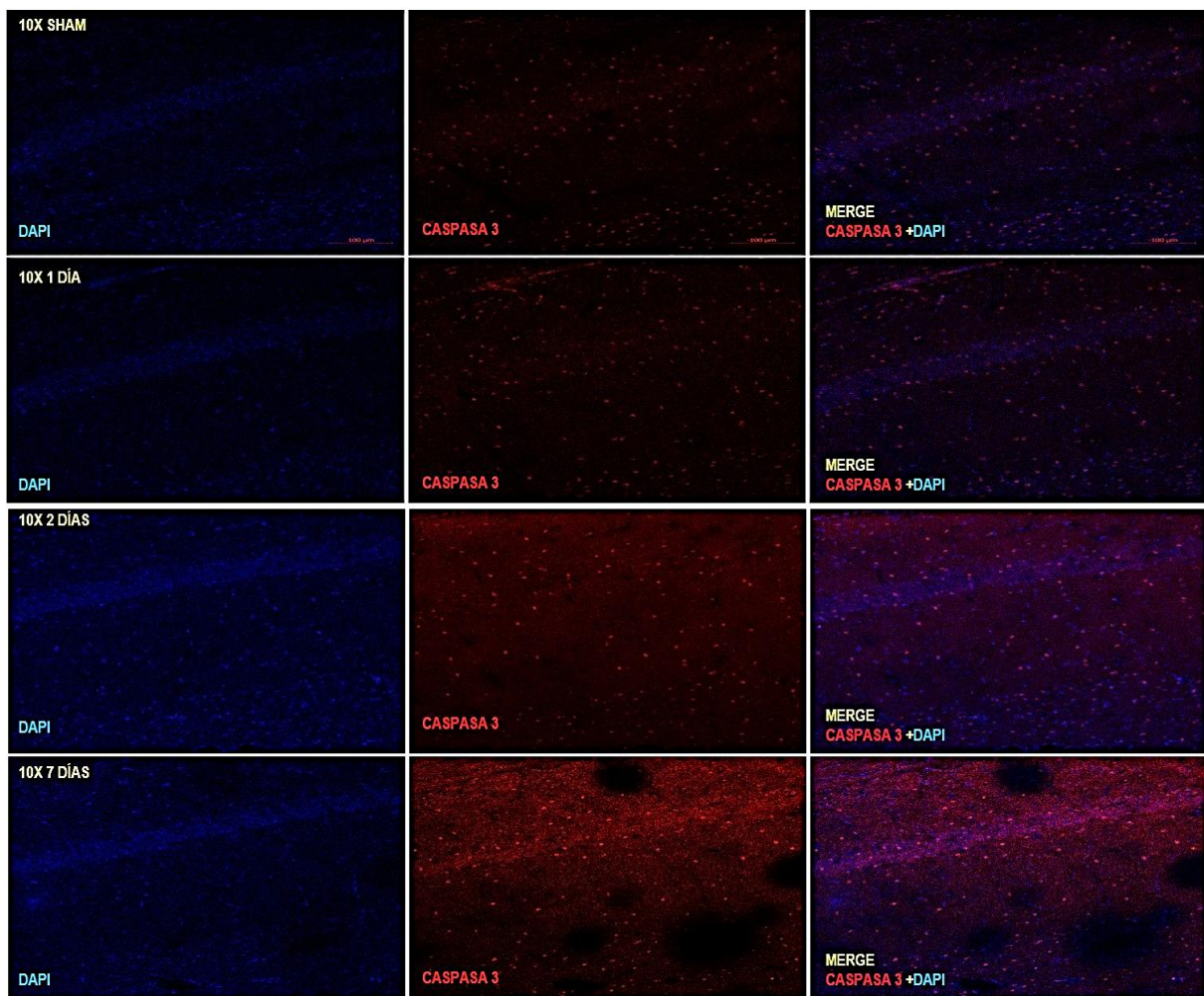


Fig. 28. Curso temporal de la expresión de caspasa-3 en la región CA1. Cortes coronales. Las rebanadas se incubaron con un anticuerpo anti caspasa-3 (rojo) y DAPI (azul). Las muestras se procesaron para detectar Alexa 594 (objetivo 10X; $n=3$).

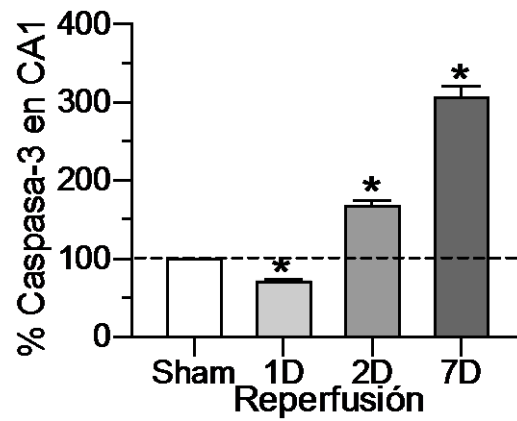


Fig. 29. La isquemia incrementa la expresión de la caspasa 3 en la región CA1 del hipocampo. Gráfica de barras normalizada. IMF de Caspasa-3. Los valores de la IMF se obtuvieron como se describen en materiales y métodos. n=3, *= p<0.05.

8. DISCUSIÓN

8.1. Cambios estructurales en el hipocampo generados por la isquemia

La oclusión de la arteria común izquierda es un modelo de isquemia focal transitoria que causa alteraciones estructurales, de acuerdo con el análisis curso-temporal realizado en el presente trabajo. Las tinciones realizadas con la técnica de hematoxilina-eosina corroboraron que la técnica de oclusión arterial realizada es funcional y replica los resultados ya conocidos en la literatura (Kirino y Sano, 1984; Pulsinelli y Brierley, 1979; Rod y Auer, 1992; Smith *et al.*, 1984; DeGirolami y Marcoux, 1984; Shinno *et al.*, 1997).

Las observaciones realizadas en el tejido tratado con hematoxilina eosina confirmaron que el daño generado por la isquemia en el hipocampo es diferencial, pues sistemáticamente se observó alta vulnerabilidad de la región CA1, seguido por la región CA3 y el GD, siendo éste último el menos dañado (Kirino y Sano, 1984; Pulsinelli y Brierley, 1979; Rod y Auer, 1992; Smith *et al.*, 1984; DeGirolami y Marcoux, 1984; Shinno *et al.*, 1997). En la literatura se ha demostrado que el cambio estructural en el hipocampo tras la oclusión arterial se observa a partir del día 3 PRF y se agudiza al 7 PRF, comportamiento que se repitió en nuestro estudio. Una diferencia que hay que recalcar, es que, a diferencia de la literatura previa que ha reportado que la región CA1 es la más vulnerable al daño isquémico tras periodos breves de isquemia (≤ 15 min), y que no existen cambios aparentes en el GD y la región CA3, nuestros resultados muestran que, a pesar de ser menor, el daño isquémico también afecta a la región CA3 y al GD. Las discrepancias entre nuestros resultados y lo reportado en la literatura puede explicarse por las diferencias metodológicas: por ejemplo, los resultados varían dependiendo del tipo de modelo de isquemia que se utilice (isquemia focal o global, transitoria); también, influye mucho la elección de la cepa de roedor utilizada en el estudio (diversas cepas de gerbos, ratas y ratones), así como la elección de la región hipocampal a analizar (ventral o dorsal). Por ejemplo, la gran mayoría de los estudios realizados y reportados son en la porción del hipocampo dorsal, ya que se presenta

mayor daño que en el hipocampo ventral (Kirino y Sano, 1984; Schmidt-Kastner y Hossman, 1988; Schmidt *et al.*, 1984, Schmidt-Kastner y Freund, 1991). El tipo de isquemia donde han reportado que CA1 es más vulnerable que GD y CA3 es la isquemia global transitoria en ratas y en gerbos mongolianos (Pulsinelli y Brierley, 1979; Kirino y Sano, 1984; Shinno *et al.*, 1997). Sin embargo, en los gerbos, la isquemia global necesariamente implica la ligación de ambas arterias carótidas (izquierda y derecha), mientras que en ratas, la ligación de cuatro vasos sanguíneos (arterias vertebrales y carótidas, izquierda y derecha en ambos casos) (Pulsinelli *et al.*, 1982) o las arterias carótidas combinada con una hipotensión severa (Smith *et al.*, 1984). El modelo experimental que nosotros usamos fue el de isquemia focal en rata Wistar, en donde el daño isquémico está dado por la oclusión de la arteria carótida común izquierda, es decir, un solo vaso sanguíneo, que implica una mayor circulación sanguínea colateral dada por el círculo de Willis (Lee, 1995).

8.2. Expresión de VEGF y CD31 después de un daño isquémico transitorio

La angiogénesis es una característica esencial de una serie de procesos fisiológicos importantes como son la cicatrización de heridas, la reparación y el desarrollo de tejidos (DeLisser *et al.*, 1994). En este contexto, CD31 es una integrina que se expresa en las células endoteliales y juega un papel muy importante en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Albelda *et al.*, 1990). Por otro lado, se conoce que en respuesta a la hipoxia, el VEGF se libera y actúa sobre las células endoteliales para promover la formación de los vasos sanguíneos (Neufeld *et al.*, 1999; Petrova *et al.*, 1999). Nuestros resultados mostraron que la inmunoreactividad al VEGF aumenta en todas las regiones del hipocampo desde el día 1 PRF y se incrementa en mayor grado al día 15 PRF. De manera interesante, observamos que la expresión de la marca de CD31 tiene un comportamiento similar a la del VEGF, ya que el incremento en su expresión comienza a partir del día 1 PRF, alcanzando su expresión máxima al día 15 PRF.

Fue notorio que en nuestro estudio pudimos observar evidencia que indica colocalización entre ambos marcadores, lo que sugiere que las células endoteliales se activan tras la isquemia e inician la secreción del VEGF. Sin embargo, nuestros resultados no descartan que existan otras fuentes de VEGF, ya que éste puede provenir de otros componentes de la unidad neurovascular (células endoteliales, astrocitos y neuronas) (Attwell y Ladecola, 2002).

El crecimiento vascular también depende de la señalización paracrina de otros factores vasculares como el factor derivado de plaquetas (PDGF) y las angiopoyetinas (Ang). Se ha descrito que estos factores estabilizan la vasculatura y protegen al endotelio de diferentes estímulos de daño, a través de las señales de supervivencia. Estudios recientes sugieren que las células endoteliales (en específico, los pericitos que cubren al endotelio) son susceptibles a la isquemia (Hall *et al.*, 2014) y que las células endoteliales son capaces de producir VEGF endógeno (Lee *et al.*, 2007). El VEGF endógeno producido por las células endoteliales es secretado de manera autocrina y paracrina y es un factor vascular muy importante para la homeostasis vascular, en especial, para la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos (Heloterä y Alitalo, 2007).

Para poder interpretar el papel de los factores vasculares en el cerebro, se asume que CA3 y CA1 reciben el mismo impacto isquémico en distintos modelos, por ejemplo, un idéntico nivel en la reducción del flujo sanguíneo cerebral. Por ello, se ha estudiado la anatomía vascular en el hipocampo. Estudios realizados con inyecciones de tinta señalan que la región CA3 presenta más densidad vascular que CA1, pero estas diferencias no son muy grandes (Duvernoy *et al.*, 2013). Otros estudios se han enfocado al estudio en la densidad de capilares, encontrando que no existe diferencia entre CA3 y CA1, tanto en ratas como en humanos, pero que la región de menor densidad capilar es la CP del GD (hilus) (Grivas *et al.*, 2003; Ingraham *et al.*, 2008; Czéh *et al.*, 2010; Løkkegaard *et al.*, 2001) y esto puede relacionarse con la vulnerabilidad que tienen las células hilares a la isquemia. También se ha marcado la perfusión de capilares, encontrando que existe menos número de capilares perfundidos en CA1 que en CA3 en condiciones basales, y ésta diferencia se marca

más después de la isquemia (Imdahl y Hossmann, 1986; Cavaglia *et al.*, 2001). La explicación para la selectividad al daño isquémico es que el arreglo de las pequeñas arterias y capilares genera gradientes diferentes en el flujo sanguíneo (Schmidh y Freund, 1991). Por tanto, en la isquemia, los factores macrovasculares ocasionan que la región de CA1 y la CP reciban menos flujo sanguíneo residual que CA3.

Nuestro estudio se enfocó en analizar regionalmente la expresión de los marcadores VEGF y CD31 sin hacer división por los estratos constituyentes del hipocampo. Sin embargo, nuestras microfotografías sugieren que en la región de CA1 y el GD existe un aumento de la expresión de la marca de CD31, que pudiera estar relacionada a un aumento en la densidad vascular y/o número de vasos sanguíneos (capilares). En contraste, a pesar de que la región CA3 también tuvo un incremento en la expresión de la marca de CD31. Razón por la cual, es difícil hacer una conclusión objetiva desde el punto de vista de nuestro estudio. Lo que podemos sugerir es que el VEGF secretado de los diferentes componentes de la unidad neurovascular durante y después de la isquemia actúa de manera autocrina y paracrina, que provee de señales de supervivencia en las neuronas y que promueve el aumento en la marca de CD31, es decir, que promueve la angiogénesis, y que en conjunto, ambos factores, pudieran actuar como un sistema endógeno de protección tras la isquemia.

Existen factores tróficos que han sido encontrados en patrones específicos en el cerebro y a los cuáles se les ha atribuido un papel neuroprotector y se les ha involucrado en la vulnerabilidad selectiva a la isquemia. Los estudios han sido realizados en varios modelos de isquemia para el factor de crecimiento neural (NGF) (Lindvall *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 1993), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Lindvall *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 1993; Kokaia *et al.*, 1996), neurotrofina 3 (NT-3) (Lindvall *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 1993), el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF2) (Takami *et al.*, 1992) y otros más que inducen protección contra el daño isquémico. El cerebro expresa HIF-1 α , un factor de transcripción que media la respuesta a la hipoxia (Kietzmann *et al.*, 2001; Semenza, 2012) y que se expresa globalmente en las neuronas del hipocampo. Uno de los blancos mejor descritos de HIF-1 α , es el gen del VEGF tras la isquemia (Pichiule *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2000),

pero poco se ha descrito acerca del papel que pudiera tener el VEGF en la susceptibilidad a la isquemia. Además, el efecto angiogénico del VEGF implica una respuesta antiapoptótica que promueve la supervivencia de las células endoteliales, a través de la vía de señalización del receptor para VEGF tipo II (VEGFR-2) y la cinasa 3 del fosfatidilinositol (PI3K)/Akt (Gerber *et al.*, 1998). Esta vía de señalización también está involucrada en los efectos de supervivencia celular del factor de crecimiento tipo insulina 1 sobre las neuronas cerebelares (Dudek *et al.*, 1997) y del factor neurotrófico derivado de la glía sobre las motoneuronas (Soler, 1999). El VEGF parece tener efectos neurotróficos al estimular el crecimiento axonal e incrementar la supervivencia de las neuronas cervicales superiores de la raíz dorsal (Sondell *et al.*, 1999) y promover la supervivencia de las neuronas mesencefálicas en medio de cultivo de rata (Silverman, W.F., 1999). Es por ello que, nosotros sugerimos que las diferencias en la expresión del VEGF en las diferentes regiones del hipocampo están involucradas en las diferencias de susceptibilidad a la isquemia y que pudiera actuar también como un factor neurotrófico, pero se necesitaría realizar un estudio más fino para poder afirmar esta aseveración.

8.3.Oxidación de proteínas y cambios en la expresión de la caspasa-3 después de un daño isquémico transitorio en el hipocampo.

En el sistema nervioso central, la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), está involucrada en la neurodegeneración y está asociada al daño neuronal que induce por ejemplo, la hipoxia y la hipoglucemia (Halliwell *et al.*, 1992; Friberg *et al.*, 2002).

El estrés oxidativo (EO) es originado por un desbalance entre la sobreproducción de ROS y/o RNS y la degradación enzimática o no enzimática de estas especies de alta reactividad. Cuando existe una sobreproducción o un bajo nivel de desintoxicación de ROS y RNS debido a algún tipo de daño, como la isquemia, se presenta un efecto en detrimento a las células caracterizado por la modificación

química de lípidos, proteína y ácidos nucleicos. Las modificaciones oxidativas macromoleculares causan el daño neuronal (Wang y Michaelis, 2010).

Los resultados obtenidos con *hypoxyprobe* indican que la formación hipocampal responde inmediatamente a la isquemia generando un daño oxidativo; de igual manera nuestros resultados sugieren que el GD tiende a contrarrestar el estrés oxidativo inmediatamente. Las células han desarrollado mecanismos antioxidantes para contrarrestar el efecto potencial dañino de las ROS y RNS. Estos mecanismos incluyen enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y las tioredoxinas), antioxidantes no proteicos (glutatión, α -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubina y coenzima Q10) (Wang y Michaelis, 2010).

Cantidades excesivas de ROS y RNS generan EO en las neuronas. Aún así, la vulnerabilidad neuronal al estrés oxidativo varía dependiendo de la región cerebral. En este sentido, las neuronas piramidales de CA3 y CA1 responden de forma muy diferente al mismo evento. En CA1, las neuronas piramidales sufren muerte celular masiva, mientras que la mayoría de las neuronas de CA3 sobreviven (Wilde *et al.*, 1997; Vornov *et al.*, 1998; Sarnowska, 2002; Wang *et al.*, 2005). Nuestros resultados con *hypoxyprobe* muestran un efecto dependiente del tiempo y de la región analizada. Para poder relacionar el efecto del EO sobre el detrimento de las neuronas en las regiones del hipocampo, se midió la expresión de la caspasa-3 (como indicador de daño isquémico y de apoptosis). Los resultados sugieren que la caspasa-3 incrementa su expresión en todas las regiones del hipocampo al día 2 PRF. Para el día 7 PRF, la expresión de caspasa-3 es más evidente en el GD y la región CA1, pero para la región CA3 se suprime la expresión. Esto podría sugerir que a pesar de que el EO persista en la región de CA3 hasta el día 7 PRF y en niveles comparables al EO del GD y región CA1, puede conllevar el daño isquémico (daño oxidante) a través de mecanismos de supresión en la activación de caspasa-3. En tanto que, para la región CA1 persiste el EO al día 7 PRF y el aumento en la expresión en la caspasa 3, lo cual sugiere que en este día CA1 no ha podido conllevar el daño isquémico. Y finalmente, en el GD aparentemente existe una disminución del EO al día 7 PRF, pero el daño isquémico sigue presente.

Por otro lado, se han medido los valores de ROS en las mitocondrias aisladas de neuronas de las regiones CA3 y CA1, encontrando que existen valores más elevados de ROS, que se traducen en mayor EO en las neuronas de CA1 que las de CA3 (Mattiasson *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran valores basales de EO muy parecidos entre el GD y CA1, y valores más bajos para CA3 en comparación con las regiones anteriores (datos no mostrados). Por ello podríamos sugerir que el GD y CA1 son más susceptibles al EO que la región CA3, ya que sus niveles basales en ROS y RNS son más elevados.

8.4. Curso temporal de la expresión de marcadores de hipoxia y de daño isquémico en las distintas regiones del hipocampo

En la isquemia, los desencadenantes de la apoptosis son los radicales libres de oxígeno, la activación del receptor de muerte, daño al ADN, la activación de las proteasas y el desequilibrio iónico (Doyle *et al.*, 2008, Kerr, 1965; Kerr *et al.*, 1972; Gonzalez *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que el VEGF actúa como factor neurotrófico y provee señales de supervivencia a las neuronas en las diferentes regiones del hipocampo que puede estar mediada por la vía de señalización PI3K/Akt. El VEGF ejerce un efecto antiapoptótico y podría ser uno de los mecanismos implicados en la supresión de caspasa-3 y supervivencia neuronal en la región CA3. También podría estar involucrado en la supervivencia neuronal en el GD. En tanto que para CA1, el VEGF tendría el mismo efecto que para CA3, sin embargo la acumulación de señales de supervivencia (antiapoptóticas) contra las apoptóticas generadas por el EO y una posible falla o insuficiencia en los mecanismos antioxidantes, podrían ser suficientes para evitar la supervivencia celular en esta región. Por ello, existe muerte celular en la región CA1, que se refleja en la disminución de la densidad neuronal reportada en los diferentes estudios anatómicos, dónde se señala que a partir de los 3 días PRF y en mayor porcentaje al día 7 PRF se genera la pérdida neuronal en esta región.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

Tras la isquemia, los cambios estructurales en el hipocampo se presentan primero en la región CA1, seguido de la región CA3 y el GD. Es decir, la resistencia a la isquemia es mayor en el GD, después en la región CA3 y la región más vulnerable es CA1.

El EO generado por el insulto isquémico al hipocampo es de igual magnitud en GD y región CA1, la región CA3 presenta un mayor EO.

La expresión del VEGF se induce tras la isquemia siguiendo el mismo curso temporal en las regiones del hipocampo, sin embargo, el análisis se realizó de manera global por región, lo que no descarta que pudiese haber posibles diferencias entre las regiones.

La expresión de CD31 presenta un comportamiento muy similar al de VEGF, sigue un mismo curso temporal en las regiones del hipocampo. El análisis se realizó de manera global por región y las microfotografías sugieren un aumento mayor en la densidad vascular en GD y la región de CA1, pero se necesitaría realizar otro tipo de análisis para determinar las posibles diferencias en la expresión de este marcador.

La expresión de la caspasa-3 como indicador de daño isquémico se presenta de manera simultánea en todas las regiones del hipocampo, pero posteriormente se presenta una supresión de la expresión de la caspasa en la región de CA3, lo que nos sugiere un menor daño en esta región o una mayor capacidad de reparar/resistir al daño isquémico.

10. CONCLUSIONES

La isquemia inducida en el modelo de oclusión de la arteria carótida común izquierda provoca un estrés oxidativo en las diferentes regiones del hipocampo e induce la expresión de VEGF y CD31, marcadores de respuesta a la hipoxia, así como un aumento de la caspasa-3. Aunque todas las regiones del hipocampo presentaron cambios estructurales y fueron susceptibles al efecto de la isquemia, la región CA1 fue la más afectada seguido por CA3 y siendo el GD la región más resistente a este fenómeno.

Del presente trabajo podemos concluir puntualmente lo siguiente:

- El proceso isquémico produjo cambios estructurales que fueron observados primero en la región CA1, después en CA3 y finalmente en el GD.
- La oxidación proteica se presentó simultáneamente en todas las regiones del hipocampo examinadas, siendo mayor en la región CA3.
- La expresión de los marcadores de respuesta a la hipoxia (VEGF y CD31) presentó un curso temporal similar en las regiones hipocampales examinadas.
- La expresión de la Caspasa-3 se presentó de manera simultánea en todo el hipocampo.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis por estratos en las diferentes regiones del hipocampo.
- Correlacionar estos hallazgos con las posibles alteraciones electrofisiológicas que experimenta el hipocampo en este modelo de isquemia.
- Correlacionar la expresión de los diferentes marcadores utilizados en el presente trabajo con las posibles alteraciones que experimentan las neuronas inhibitoras (interneuronas) del hipocampo.
- Estudiar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas hipocámpales en periodos de tiempo mayores (por ejemplo, tres meses después de la CCAO).

12. REFERENCIAS

Acker ,T., Fandrey, J., Acker, H. (2006). The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc Res*, 71: 195–207.

Aitken, P. G. & Schiff, S. J. Selective neuronal vulnerability to hypoxia in vitro. (1986). *Neuroscience Letters*, 67(1): 92-96.

Albelda, SM., Oliver, PD., Romer, LH., Buck, CA. (1990). EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 110(4):1227-37.

Amaral, D. & Lavenex, P. (2006). Ch 3. Hippocampal Neuroanatomy. En Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.

Andersen, P. Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. & O'Keefe, J. (2006). Capítulo 1, Capítulo 2, Capítulo 3 y Capítulo 8. In Andersen, P., Morris, R., Amaral, D, Bliss, T., O'Keefe, J. (eds). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.

Arbelaez, A., Castillo, M. & Mukherji, SK. (1999). Diffusion-weighted MR imaging of global cerebral anoxia. *American Journal of Neuroradiology*, 20(6): 999-1007.

Arteel, G. E., Thurman, R. G. & Raleigh, J. A. (1998). Reductive metabolism of the hypoxia marker pimonidazole is regulated by oxygen tension independent of the pyridine nucleotide redox state. *Eur. J. Biochem*, 253: 743-750.

Arteel, G. E., Thurman, R. G., Yates, J. M., and Raleigh, J. A. (1995). Evidence that hypoxia markers detect oxygen gradients in liver: pimonidazole and retrograde perfusion of rat liver. *Br J Cancer*, 72: 889-895.

Attwell, D. & Ladecola, C. (2002). The neural basis of functional brain imaging signals.

Trends Neuroscience, 25:621–625.

Bischoff, J. (1997). Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest*, 99: 373-376.

Brüne, B., Zhou, J. (2007). Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc Res*, 75: 275–282.

Busl, K. M. and D. M. Greer. (2010). Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation*, 26(1): 5-13.

Bussink, J., Kaanders, JH., Strik, AM. & van der Kogel, AJ. (2000). Effects of nicotinamide and carbogen on oxygenation in human tumor xenografts measured with luminescence based fiber-optic probes. *Radiother Oncol*, 57: 21-30.

Cain, K., Bratton, SB., Langlais, C., Walker, G., Brown, DG., Sun, XM. & Cohen, GM. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDapoptosome complexes. *J. Biol. Chem*, 275, 6067–6070.

Calvert, J. W. and J. H. Zhang. (2005). Pathophysiology of an hypoxic-ischemic insult during the perinatal period. *Neurological Research*, 27(3): 246-260.

Caramelo, C., PeñA, JJD., Castilla, A., Justo, S., De Solís, AJ., Neria, F., Peñate, S. & González-Pacheco, FR. (2006). Respuesta a la hipoxia: Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina*, 66: 155–164.

Carlos, C., L, R. J., Erwin, C., Antonio, A., Carolina, L., M, M. L., De, L. I. (2011).

Cavaglia, M., Dombrowski, SM., Drazba, J., Vasanji, A., Bokesch, PM. & Janigro, D. (2001). Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Res*, 910:81–93.

Chacon, E., Morrow, C. J., Leon, A. A., Born, J. L., and Smith, B. R. (1988). Regioselective formation of a misonidazole-glutathione conjugate as a function of pH during chemical reduction. *Biochem Pharmacol*, 37: 361-363.

Chalela, JA., Wolf, RL., Maldjian, JA., Kasner, SE. (2001). MRI identification of early white matter injury in anoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology*, 27; 56(4):481-5.

Chapman, J. D., Franko, A. J., & Sharplin, J. (1981). A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *Br. J. Cancer*, 43: 546-550.

Cho S, Wood A, Bowlby MR. (2007). Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr Neuropharmacol*, 5(1):19-33.

Curtis, TM., Gardiner, TA. & Stitt, AW. (2009). Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye (Lond)*, 23(7):1496-508.

Czéh, B., Abumaria, N., Rygula, R. & Fuchs, E. (2010). Quantitative changes in hippocampal microvasculature of chronically stressed rats: no effect of fluoxetine treatment. *Hippocampus*, 20:174–185.

Daisu, M., Hatta, T., Sakurai-Yamashita, Y., Nabikaa, T. & Moritake, K. (2009). Quantitative Analysis of Delayed Neuronal Death in the Hippocampal Subfields of SHRSP and SHR. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(4): 557-562.

D'Amelio, M., Sheng, M. & Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci*, 35(11):700-9.

DeGirolami, UC. R., Marcoux, FW. (1984). Selective necrosis and total necrosis in focal cerebral ischemia. Neuropathologic observations on experimental middle cerebral artery occlusion in the macaque monkey. *J Neuropathol Exp Neurol*, 43(1): 57-71.

DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*, 151(3):671-7.

Delisser, H. M., Christofidou-solomidou, M., Robinson, C. S., Wexler, R. S., Kerr, J. S., Garlanda, C., Albelda, S. M. (1997). Involvement of Endothelial PECAM-1 / CD31 in Angiogenesis, 151(3), 671–677.

DeLisser, HM., Newman, PJ., Albelda, SM. (1994). Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today*, 15:490-495:407-422.

Dewhirst, MW. (2009). Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat Res*, 172: 653–665.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet*. (2008). May, 10;371(9624):1612-23. Review.

Doyle, KP., Simon, RP., Stenzel-Poore, MP. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3):310-8. Review.

Dudek, H., Datta, SR., Franke, TF., Birnbaum, MJ., Yao, R., Cooper, GM., Segal, RA., Kaplan, DR. & Greenberg ME. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 275(5300):661-5.

Duvernoy, H., Cattin, F., Risold, P-Y. (2013). The human hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. fourth ed. Heidelberg: Springer.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, 7:663-98.

Er, E., Oliver, L., Cartron, P.F., Juin, P., Manon, S. & Vallette, F.M. (2006). Mitochondria has the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10):1301-11. Review.

Folkman, J. (1995). Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 333:1757-1763.

Folkman, J., Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267:10931-10934.

Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol*, 16, 4604–4613.

Friberg, H., Wieloch, T., and Castilho, R. F. (2002). Mitochondrial oxidative stress after global brain ischemia in rats. *Neurosci. Lett*, 334, 111–114.

Gee, C.E., Benquet, P., Raineteau, O., Rietschin, L., Kirbach, S.W. & Gerber, U. (2006). NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 23(10):2595-603.

Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V. & Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 13;273(46):30336-43.

González, R.G., Hirsch, J.A., Lev, M.H., Schaefer, P.W., Schwamm, L.H. (2006). Acute Ischemic Stroke. Imaging and Intervention. Springer.

Green, D.R., Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684):626-9. Review.

Grivas, I., Michaloudi, H., Batzios, C., Chiotelli, M., Papatheodoropoulos, C.,

Kostopoulos, G. & Papadopoulos, GC. (2003). Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Res*, 971:245–249.

Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK. (2008). Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin*, Vol.26, No.4, pp. 871-95, ISSN 1557-9875.

Hall, CN., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, NB., Mishra, A., Sutherland, BA., O'Farrell, FM., Buchan, AM., Lauritzen, M. & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508:55–60.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., and Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med*, 119, 598–620.

Harukuni I, Bhardwaj A. (2006). Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin*, 24(1):1-21.

Heloterä, H., Alitalo, K. (2007). The VEGF family, the inside story. *Cell*, 130(4):591-2.

Hofmann, K. & Bucher, P. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci*, 22, 155–156.

Hofmeijer J, van Putten MJ. (2012). Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. *Stroke*, 43(2):607-15.

Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, Apoptosis and Medicine. Dr. Tobias Ntuli, (Ed.), InTech. Recuperado el 11/11/2016, de <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review>.

Hypoxyprobe Store. (2006). History of Hypoxyprobe Development. Recuperado el 11/11/2016, <http://www.hypoxyprobe.com/history-of-hypoxyprobe.html>.

Imdahl, A. & Hossmann, KA. (1986). Morphometric evaluation of postischemic capillary perfusion in selectively vulnerable areas of gerbil brain. *Acta Neuropathol*, 69:267–271.

Ingraham, JP., Forbes, ME., Riddle, DR. & Sonntag, WE. (2008). Aging reduces hypoxia-induced microvascular growth in the rodent hippocampus. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63:12–20.

Irwin, DC., McCord, JM., Nozik-Grayck, E., Beckly, G., Foreman, B., Sullivan, T., White, M., Crossno, TJ. Jr., Bailey, D., Flores, SC., Majka, S., Klemm, D. & van Patot MC. (2009). A potential role for reactive oxygen species and the HIF-1 α -VEGF pathway in hypoxia-induced pulmonary vascular leak. *Free Radic Biol Med*, 1;47(1):55-61.

Jin, G. Y., Li, S. J., Moulder, J. E. & Raleigh, J. A. (1990). Dynamic measurements of hexafluoromisonidazole (CCI-103F) retention in mouse tumours by $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ magnetic resonance spectroscopy. *Int. J. Radiat. Biol*, 58: 1025-1034.

Jin, KL., Mao, XO., Nagayama, T., Goldsmith, PC. & Greenberg, DA. (2000). Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α by global ischemia in 7rat brain. *Neuroscience*, 99:577–585.

Johnston, D. & Amaral, D.G. (2004). Hippocampus. In Shepherd, G.M. (ed) *The Synaptic Organization of the Brain*. OUP USA.

Kerr, J. (1965). A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 90, 419-435.

Kerr, JF., Wyllie, AH., Currie, AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239-57. Review.

Kesner RP and Hopkins RO. (2006). Mnemotecn function of the hippocampus: a comparison between animal and humans. *Biol Psychol*, 73(1):3-18.

Kietzmann, T., Knabe, W. & Schmidt-Kastner, R. (2001). Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251:170–178.

Kirino, T. & K. Sano. (1984). Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol*, 62:201–208.

Kirino, T. (1982). Delayed neuronal death in gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 237:57–69.

Kirino, T., A. Tamura & K. Sano. (1985). Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog. Brain Res*, 63: 39–58.

Kokaia, Z., Nawa, H., Uchino, H., Elme´ r, E., Kokaia, M., Carnahan, J., Smith, ML., Siesjo“, BK. & Lindvall, O. (1996). Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 38:139–144.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87(1):99-163. Review.

Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S. & Villunger A. (2006). BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ*, 13, 1325–1338.

Larsson, E., Lindvall, O. & Kokaia, Z. (2001). Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global

cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 913(2): 117-132.

Lee, RMKW. (1995). Morphology of Cerebral Arteries. *Pharmac. Ther*, Vol. 66, pp. 149.-173, 0163-7258(94)00071-9.

Lee, S., Chen, TT., Barber, CL., Jordan, MC., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, KP. & Iruela-Arispe, ML. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4):691-703.

Leuner, B. & Gould, E. (2010). Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annu Rev Psychol*, 61: 111–C3.

Levine, S., Payan, H. (1966). Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*), *Experimental Neurology*, Volume 16, Issue 3, Pages 255-262.

Li, J., Wang, JJ., Yu, Q., Chen, K., Mahadev, K., Zhan, SX. (2010). Inhibition of reactive oxygen species by lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice. *Diabetes*, 59: 1528–1538.

Lindvall, O., Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Smith, ML., Siesjö, BK. & Persson, H. (1992). Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:648–652.

Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*, 79, 1431–1568.

Ljungkvist, AS., Bussink, J., Rijken, PF., Raleigh, JA., Denekamp, J. & Van Der Kogel, AJ. (2000). Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48: 1529-38.

Løkkegaard, A., Nyengaard, JR., West, MJ. (2001). Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human hippocampal region. *Hippocampus*, 11:726–740.

Marti, H.H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. *J. Exp. Biol*, 207, 3233–3242.

Marti, H.H., Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 15809–15814.

Marti, H.J.H., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E., Risau, W. (2000). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am. J. Pathol*, 156, 965–976.

Mattiasson, G., Friberg, H., Hansson, M., Elmer, E., and Wieloch, T. (2003). Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation. *J. Neurochem*, 87, 532–544.

McCormick, BA., Zetter, BR. (1992). Adhesive interactions in angiogenesis and metastasis. *Pharmacol Ther*, 53:239-260.

Monacci, W.T., Merrill, M.J., Oldfield, E.H. (1993). Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am. J. Physiol*, 264, C995–C1002.

Muller, WA., Ratti, CM., McDonnell, SL., Cohn, ZA. (1989). A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, 170:399-414.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13,9–22. Review.

Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., Lyman, S., Paddock, C., Muller, W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247: 1219-1222.

Nitsch C, Goping G, Klatzo I. (1989). Preservation of GABAergic perikarya and boutons after transient ischemia in the gerbil hippocampal CA1 field. *Brain Res*, 495(2):243-52.

Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. (2011). The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300(5):R1053-69.

O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford: The Clarendon Press.

Pérez-Machado, J., Lie-Concepción, E.A. (2012). Apoptosis, action mechanism. *Revista de Ciencias Médicas La Habana*, 2012; 18 (2).

Petrova, T. V., Makinen, T. & Alitalo, K. (1999). Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell Res*, 253, 117–130.

Pichiule, P., Chávez, J.C., Xu, K., LaManna, J.C. (1999). Vascular endothelial growth factor upregulation in transient global ischemia induced by cardiac arrest and resuscitation in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 74:83–90.

Pogue, B.W., Paulsen, K.D., O'Hara, J.A., Wilmot, C.M. & Swartz, H.M. (2001). Estimation of oxygen distribution in RIF-1 tumors by diffusion model- based interpretation of pimonidazole hypoxia and eppendorf measurements. *Radiat Res*, 155: 15-25.

Polverini, P.J. (1996). Cellular adhesion molecules: newly identified mediators of angiogenesis. *Am J Pathol*, 148:1023-1029.

Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutiérrez, A., Simal-Hernández, P., Pascual-Garvi, JM., Matías-Guiu, J., Roda, JM., Barcia-Albacar, JA. (2008). Experimental models of cerebral ischemia. *Rev Neurol*, 47(8):414-26. Review. Spanish.

Pulsinelli, WA., Brierley, JB., Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 11:491-498.

Rabbani, Z. N., Mi, J., Zhang, Y., Delong, M., Jackson, I. L., Fleckenstein, K., Salahuddin, F. K., Zhang, X., Clary, B., Anscher, M. S. & Vujaskovica, Z. (2010). Hypoxia inducible factor 1a signaling in fractionated radiation induced lung injury: Role of oxidative stress and tissue hypoxia. *Radiat Res*, 173: 165–174.

Rahimi, N. (2012). The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 11(3):538-48.

Raleigh, J. A. & Koch, C. J. (1990). Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol*, 40: 2457-2464.

Raleigh, J. A., Franko, A. J., Koch, C. J., & Born, J. L. (1985). Binding of misonidazole to hypoxic cells in monolayer and spheroid culture: evidence that a side-chain label is bound as efficiently as a ring label. *Br. J. Cancer*, 51: 229-235.

Raleigh, J. A., Franko, A. J., Treiber, E. O., Lunt, J. A., & Allen, P. S. (1986). Covalent binding of a fluorinated 2-nitroimidazole to EMT-6 tumors in BALB/C mice: Detection by F-19 nuclear magnetic resonance at 2.35T. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*, 12: 1243-1245.

Raleigh, J., Franko, A., Kelly, D., Trimble, L., & Allen, P. (1991). Development of an in vivo ¹⁹F magnetic resonance method for measuring oxygen deficiency in tumors. *Magn. Res. Med*, 22: 451-466.

Raleigh, JA., Chou, SC., Arteel, GE., Horsman, MR. (1999). Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat Res*, 151: 580-9.

Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du System Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Vols. 1 and 2. A. Maloine. Paris.

Rattner, A., Yu, H., Williams, J., Smallwood, PM. & Nathans, J. (2013). Endothelin-2 signaling in the neural retina promotes the endothelial tip cell state and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(40):E3830-9.

Raz, L., Knoefel, J., Bhaskar, K. (2016). The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(1):172-86. Review.

RENAMEVASC. Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC, 12(5), 224–234. Recuperado el 11/11/2016, de <http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2013/10/Nm115-02.pdf>.

Reyes, JG., Farias, JG., Henríquez-Olavarrieta, S., Madrid, E., Parraga, M., Zepeda AB. & Moreno, R.D. (2012). The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*, 2012: 929285.

Rod, MR., Auer, RN. (1992). Combination therapy with nimodipine and dizocilpine in a rat model of transient forebrain ischemia. *Stroke*, 23:725-732.

Sakimoto, S., Kidoya, H., Naito, H., Kamei, M., Sakaguchi, H., Goda, N., Fukamizu, A., Nishida, K. & Takakura, N. (2012). A role for endothelial cells in promoting the

maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development*, 139(7):1327-35.

Sarnowska, A. (2002). Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathol*, 40, 101.

Schiff, SJ. & Somjen, GG. (1987). The effect of graded hypoxia on the hippocampal slice: an in vitro model of the ischemic penumbra. *Stroke*, 18(1):30-7.

Schmidt-Kastner, R. & Freund, T. F. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40(3): 599-636.

Schmidt-Kastner, R. & Hossmann, KA. (1988). Distribution of ischemic neuronal damage in the dorsal hippocampus of rat. *Acta Neuropathol*, 76:411–421.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. & Peter, ME. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem*, 254, 439–459. Review.

Schurr, A., Rigor, BM. (1989). Cerebral ischemia revisited: new insights as revealed using in vitro brain slice preparations. *Experientia*, 45(8):684-95.

Semenza, GL. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148:399–408.

Shapiro, NI., Yano, K., Okada, H., Fischer, C., Howell, M., Spokes, KC., Ngo, L., Angus, DC. & Aird, WC. (2008). A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock*, 29(4):452-7.

Shinno, K., Zhang, L., Eubanks, JH., Carlen, PL. & Wallace, MC. (1997). Transient ischemia induces an early decrease of synaptic transmission in CA1 neurons of rat hippocampus: electrophysiologic study in brain slices. *J Cereb Blood Flow Metab*,

17(9):955-66.

Silverman, W. F., Krum, J. M., Mani, N. & Rosenstein, J. M. (1999). Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience*, 90(4):1529-41.

Smith, ML., Auer, RN., Siesjo, BK. (1984). The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2- 1 0 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*, 64:319-322.

Soler, RM., Dolcet, X., Encinas, M., Egea, J., Bayascas, JR., Comella, JX. (1999). Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci*, 19(21):9160-9.

Sondell, M., Lundborg, G. & Kanje, M. (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*, 19(14):5731-40.

Squire, LR. (1994). Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning in memory. In: Schacter DL and Tulving E. Eds. *Memory system* 1944. Cambridge MA, MIT Press 1944, 203-231.

Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A., Greenberg, D.A., (2003). VEGF induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest*, 111, 1843–1851.

Sutherland, RJ. & Rudy, JW. (1989). Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. *Psychobiology*, 17:129-144.

Takami, K., Iwane, M., Kiyota, Y., Miyamoto, M., Tsukuda, R. & Shiosaka, S. (1992). Increase of basic fibroblast growth factor immunoreactivity and its mRNA level in rat brain following transient forebrain ischemia. *Exp Brain Res* 90:1–10.

Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Kogure, K., Obinata, M., Shibahara, S. (1993). Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience*, 55:23–31.

Taylor, RC., Cullen, SP. & Martin, SJ. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3):231-41. Review.

Varghese, A. J. (1983). Glutathione conjugates of misonidazole, *Biochem Biophys Res Commun*. 112: 1013-1020.

Varghese, A. J., Gulyas, S. & Mohindra, J. K. (1976). Hypoxia-dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2- propanol by Chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer Res*, 36: 3761-3765.

Varia, MA., Calkins-Adams, DP., Rinker, LH., Kennedy, AS., Novotny, DB., Fowler, WC. Jr. & Raleigh, JA. (1998). Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 71(2):270-7.

Vornov, J. J., Park, J., and Thomas, A. G. (1998). Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidativestress in organotypic hippocampal culture. *Exp. Neurol*, 149, 109–122.

Wang, X., Michaelis, EK. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*, 2:12.

Wang, X., Pal, R., Chen, X. W., Limpeanchob, N., Kumar, K. N., and Michaelis, E. K. (2005). High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res*, 140, 120–126.

Wang, Y., Kilic, E., Kilic, Ü., Weber, B., Bassetti, C.L., Marti, H.H., Hermann, D.M., (2005). VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain*, 128, 52–63.

Wilde, G. J., Pringle, A. K., Wright, P. & Iannotti, F. (1997). Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J. Neurochem*, 69, 883–886.

World Health Organization. (2012). Stroke, Cerebrovascular accident. Recuperado el 11/11/2016, de http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/.

Wuchter, C., Ruppert, V., Schrappe, M., Dorken, B., Ludwig, WD., Karawajew, L. (2002). In vitro susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to interleukin 7, and early cyto reduction in vivo in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 99:4109-15.

Yoshimura, M., Itasaka, S., Harada, H., Hiraoka, M. (2013). Microenvironment and Radiation Therapy. *BioMed Research International*, 2013:685308.

Zepeda, AB., Pessoa, A. Jr., Castillo, RL. Figueroa, C.A., Pulgar, VM. & Farías, J.G. (2013). Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct*, 31: 451–459.

Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., van Bruggen, N. & Chopp, M. (2000). VEGF enhances angiogenesis and promotes blood–brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest*, 106, 829–838.

Zola-Morgan, S., Squire, LR. & Amaral, DG. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*, 6:2950-2967.

Zola-Morgan, S., Squire, LR., Rempel, NL., Clower, RP. & Amaral, DG. (1992). Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *J Neurosci*, 12:2582-2596.