



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

DEPARTAMENTO DE NEUROPATOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto del factor de crecimiento vascular endotelial
(VEGF) sobre la remodelación estructural cerebral en
un modelo in vivo de isquemia focal transitoria”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JESÚS EDGAR HERNÁNDEZ PONCE



Director de Tesis: Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo

Ciudad de México

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Ma. Teresa Corona Ortega
VOCAL: Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo
SECRETARIO: Dra. Ma. Isabel Soto Cruz
SUPLENTE: M. en C. Fernando Francisco Hernández Clemente
SUPLENTE: M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

**Departamento de Neuropatología Molecular
División de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular
Ciudad Universitaria, UNAM**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo _____

SUSTENTANTE: Jesús Edgar Hernández Ponce _____

PROYECTO REALIZADO CON EL FINANCIAMIENTO:

CONACYT (219542)

DGAPA- Beca PAPIIT (IN226617)

Agradecimientos académicos:

Agradezco las facilidades presentadas para el desarrollo de este trabajo de la Dra. Ruth Rincón Heredia de la unidad de microscopía, de la Dra. Claudia Rivera Cerecedo del bioterio, y de la QFB María Cristina Aranda Fraustro; técnico académico del laboratorio y de Ana María Escalante Gonzalbo y Francisco Pérez Eugenio de la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Todos los experimentos de cirugía fueron realizados por la Médico Veterinario Zootecnista Berenice Nohemi Bernal Vicente como parte de su proyecto de Maestría en el programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Agradezco a mis sinodales; Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo, Dra. Ma. Isabel Soto Cruz, M. en C. Fernando Francisco Hernández Clemente, M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, por el tiempo y dedicación invertidos en la culminación de este proyecto de investigación.

Agradecimientos personales:

Agradezco...a la Vida, a la célula eucariota, a Dios, a la doble hélice de DNA, al Big Bang, al átomo, al bosón de Higgs (aún no me pongo de acuerdo) gracias por permitirme existir, ser parte del cosmos, y ser un todo con el universo, gracias por darme la oportunidad de ser una persona libre, sana y feliz.

A mis padres, simplemente sin ustedes no hubiera llegado hasta donde estoy.

Mama; gracias por ese amor incondicional, por esas lecciones de vida que uno no aprende en la academia, ni en la vida laboral, por ser mi eterna escuela de valores desde que iba al kínder, por siempre preocuparte de que siguiera el buen camino, por tus desvelos y preocupaciones (y por haberme soportado en mi época loca jeje), por mis cursos intensivos de orden y limpieza que (ahora siendo adulto) por fin comprendo que son tan importantes en el día a día, por siempre creer en mí, y apoyarme en cada paso y decisión que he tomado, gracias por mis innumerables lecciones de cocina; que créeme, siempre me acompañarán. Gracias por enseñarme el valor del perdón, y el de no mentir, pero sobretodo el de la caridad hacia los otros. Gran parte de mi ser sensible y sentimental te lo debo a ti, esto somos ¡Muchas gracias por todo esto y más mama, TE ADORO!

Papa; gracias por ser esa mano rígida pero cariñosa en mi vida, por enseñarme el verdadero valor del dinero, del ahorro, del esfuerzo, del trabajo duro y honesto, de la palabra y el compromiso de un hombre, por mostrarme que no está mal caer, siempre y cuando me levante y lo vuelva a intentar con más fuerza, por haber trabajado tan duro tantos años, por las miles de horas que pasaste en el tráfico, y por haber sacrificado muchas cosas en aras de ver crecer a tus hijos, por esas semanas enteras que no te veía por los horarios, y por aún hoy no consentirme ni regalarme las cosas, por hacerme independiente y demostrarme que la vida puede ser dura pero tan hermosa como uno quiera que sea. Por haberme inculcado esa chispita de curiosidad por la ciencia y por esos libros que me comprabas de chico o los que

dejabas en la casa a mi alcance (Carl Sagan, Stephen Hawking, Isaac Asimov, etc.), que ya ves, me hicieron escribir éste; mi propio libro jeje. Tu eres parte de mi ser espiritual, natural, y hasta cósmico, gracias por siempre ser un padre firme y amoroso conmigo. ¡Te quiero muchísimo Papa!

Hermano, Mario; mi bro, gracias por ser siempre uno de mis modelos a seguir, y de hacer lo correcto, esa forma de rectitud moral, fervor laboral, visión responsable hacia el futuro, te la debo a ti, gracias por siempre preocuparte por mí, y por cuidarme y quererme como tu hermanito menor que siempre seré, aunque a veces haga cada barbaridad jeje, por hacerme ver que con esfuerzo y dedicación podemos lograr grandes metas, y por apoyarme en cuanto cosa he tomado como pasión (El dibujo, el fut, la música, patinar, el tango, el francés, la fotografía, y lo que se vaya agregando). Por azares del destino solo fuimos tu y yo, y aunque no estemos juntos físicamente siempre estás conmigo, gracias por apoyarme incondicionalmente sobretodo en ésta última etapa de mi titulación, y por esas palabras y consejos, que créeme me han servido de mucho. Eres ese amigo astral que la vida me concedió en forma de mi hermano, está de más decirte lo mucho que te quiero y lo importante que eres en mi vida porque ya lo sabes, ahora solo queda ver hacia el futuro, trabajar muy duro, lograr nuestras metas y acompañarnos en la vida mientras nos hacemos viejitos.

A toodos mis amigos de la carrera; Lalo, Eder, Ale... bueno y el resto jeje gracias por haber compartido conmigo una de las mejores etapas de mi vida, por los malos, pésimos, buenos, vergonzosos, étlicos y divertidos momentos. Colegas; por lo que fue y por lo que viene, ¡Salud!

A todas las personas que estuvieron conmigo durante este largo proceso Karina, Haydee, Varinia, Ixchel, Mara, etc. a mis compañeros del instituto; Bere, Aura, Alberto, Andrés, Isaac, Alfredo, siempre aprendí mucho de ustedes, gracias por su paciencia, colaboración y compañerismo durante 2 largos años de investigación. Maestro Fer, gracias por haber siempre confiado en mí, por exigirme más que a los otros, por retarme académicamente, por ser un maestro como se dice “De la vieja escuela” por haberme enseñado las bases científicas de la vida misma, créame que por siempre será mi mejor profesor. Luis en verdad gracias por tu apoyo, paciencia y hasta por esas largas pláticas sobre la vida, haber estudiado en tu laboratorio fue de lo mejor que me pudo haber ocurrido, no es muy común ver como alguien se enamora perdidamente de su trabajo como tú lo haces, y eso deja una gran enseñanza en mí. En verdad, gracias por todo, ¡Si se pudo!

A mis compañeros laborales, ustedes saben quiénes son, gracias por hacerme crecer cada día profesionalmente. Y, por último, pero no menos importante gracias a la Familia Falcón, por haberme dado tanto en tan poco tiempo y por haberme abierto las puertas de su casa y hacerme sentir como de su familia, Sra. Ivonne, Brenda, estuvieron conmigo en ésta última etapa de mi logro más importante hasta el momento, en verdad gracias por su apoyo, paciencia y comprensión. Fannie; Snowflakes, caray mujer, bueno, por fin lo logré, aquí está escrito un capítulo más de mi vida, simplemente te doy las gracias por haber estado conmigo en uno de mis peores y mejores momentos, gracias por tu tiempo, y todas nuestras locuras, por la vida que compartimos y por todo lo que me diste sin medida, por siempre y para siempre... ¡GRACIAS!.

CONTENIDO

RESUMEN	7
MARCO TEÓRICO	10
ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL	10
<i>Epidemiología; morbilidad y mortalidad</i>	11
<i>Clasificación del EVC</i>	12
<i>Fisiopatología de la isquemia cerebral</i>	14
<i>Isquemia y zonas del infarto</i>	15
<i>Cascada isquémica (aspectos bioquímicos)</i>	16
<i>Excitotoxicidad</i>	17
<i>Generación de especies reactivas</i>	18
<i>Respuestas moleculares a la isquemia</i>	18
<i>Regulación transcripcional en respuesta a la isquemia</i>	19
<i>Alteraciones en la BHE</i>	20
FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)	25
DISEÑO EXPERIMENTAL	28
<i>Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)</i>	28
<i>Reacción de reducción del TTC</i>	30
<i>Tinción de Nissl</i>	32
<i>Metodo de Lowry y fluorescencia del azul de Evans</i>	33
<i>Inmunohistofluorescencia</i>	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
HIPOTESIS	37
OBJETIVOS	38
GENERAL	38
PARTICULARES	38
METODOLOGÍA	39
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	39
INDUCCIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITORIA (CIRUGÍA MCAO)	39
ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO	39
OBTENCIÓN DE TEJIDO CEREBRAL	40
ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LA DISRUPCIÓN DE LA BHE	40
EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO CEREBRAL	41
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA PERMEABILIDAD DE LA BHE POR ESPECTROFLUOROMETRÍA	42
EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LA VIABILIDAD NEURONAL, CONTEOS NEURONALES	43
EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA FUGA DE PROTEÍNAS EN LA BHE POR FLUORESCENCIA	45
INMUNOHISTOFLUORESCENCIA	45
RESULTADOS	47
VOLUMEN DE INFARTO	47
VIABILIDAD NEURONAL	48
PERMEABILIDAD DE LA BHE	51
CAMBIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA BHE	54
ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
CONCLUSIONES	61

PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	69
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	69
CARTELES	72

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) administrado de manera exógena con el fin de analizar sus efectos sobre el volumen de infarto, viabilidad neuronal y preservación de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). En el laboratorio utilizamos un modelo *in vivo* de infarto cerebral en ratas producido por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 90 minutos con un periodo de reperusión de 24 horas en el que a los 30 minutos, administramos mediante inyecciones intracerebroventriculares (I.C.V.) diferentes tratamientos como: 50 y 100 ng de VEGF recombinante, el inhibidor selectivo del VEGFR2 (SU-1498) y vehículo (solución salina fisiológica) como control. Encontramos una disminución significativa del volumen de infarto con la dosis baja de 50 ng de VEGF, sin embargo al incrementar la dosis a 100 ng de VEGF no encontramos un mayor efecto neuroprotector, inclusive el volumen de infarto resultó muy similar al grupo no tratado, dados estos resultados probamos cómo se modula el efecto neuroprotector al inhibir al VEGFR2 y encontramos menor daño en comparación con el grupo que recibió vehículo y el grupo de dosis alta de VEGF, corroboramos estos hallazgos con el análisis por conteos neuronales. En nuestra evaluación de la permeabilidad de la BHE encontramos que, por un lado la dosis baja de VEGF disminuye la permeabilidad del colorante azul de Evans, que en condiciones fisiológicas no atraviesa la BHE, pero por el otro, causa alteraciones en la integridad de las uniones estrechas, necesarias para mantener el correcto funcionamiento de la barrera hematoencefálica. Concluimos que con 50 ng de VEGF, se obtiene el mejor efecto neuroprotector, mayor disminución del volumen de infarto y menor muerte neuronal, en tanto que las condiciones donde se aumenta la dosis o se evalúa solo el VEGF endógeno no son favorables para la recuperación postisquémica.

ABREVIATURAS

AMPA= Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
BHE= Barrera Hematoencefálica
BSA = Albúmina de Suero Bovino
CCA = Arteria Carótida Común (Commun Carotid Artery)
CInd-5 = Claudina - 5
EVC = Enfermedad Vasculat Cerebral
FSC= Flujo Sanguíneo Cerebral
HBSS = Hanks' Balanced Salt Solution
MCA = Arteria Cerebral Media
MCAO = Middle Cerebral Artery Occlusion (Oclusión de la Arteria Cerebral Media)
NMDA = N-metil-D-aspartato
NMDAR = Receptor de NMDA
OGD = Oxygen-glucose deprivation
PBS = Buffer de fosfatos salino
PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule -1
(Molécula de adhesión plaqueta endotelial -1)
PFA = Paraformaldehído
ROS = Reactive Oxygen Species
RTKs = Receptores de tirosina cinasas
SU-1498 = Inhibidor selectivo del receptor 2 de VEGF
TCA = Ácido tricloroacético
TTC = Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolo
VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de Crecimiento Vasculat Endotelial)
VEGFR2 = Receptor 2 de VEGF

INTRODUCCIÓN

El consumo energético en el cerebro es muy elevado en comparación con otros órganos pues con tan sólo el 2% del peso corporal éste consume 25% de la glucosa y 20% del oxígeno disponible en el cuerpo **(Belanger, Allaman et al. 2011)**, por lo que cuando este aporte es afectado, ya sea de manera permanente o transitoria, el cerebro presenta una serie de eventos fisiopatológicos encabezados por un déficit energético **(Beilharz, Williams et al. 1995)**. La disminución en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) generada por trombos puede ocasionar daño de manera irreversible, en esta zona severamente hipoperfundida conocida como foco isquémico los procesos energéticos de las células se detienen y se presenta un tipo de muerte celular súbita conocida como necrosis. Sin embargo, en la periferia del foco, la disminución del FSC no es tan severa y el tejido experimenta procesos de muerte celular más lentos, entre los que se encuentra la apoptosis **(Zhang, Wang et al. 2012)**. A esta zona de daño comprendida entre el foco isquémico y el parénquima cerebral sin daño se le conoce como penumbra isquémica. Hasta ahora, no existe manera de recuperar la viabilidad perdida en el foco isquémico, por lo que los esfuerzos terapéuticos se han centrado en la zona de penumbra al tratarse de tejido potencialmente rescatable **(Vajda 2002)**. Debido a que son múltiples los factores de riesgo y a que es difícil predecir y diagnosticar el evento, se busca comprender los mecanismos moleculares endógenos involucrados como el aumento en la expresión de genes, activación de enzimas, acción de factores tróficos, etc. que ofrezcan alternativas de neuroprotección **(Tamura, Graham et al. 1981; Bejot, Catteau et al. 2008)**.

MARCO TEÓRICO

Enfermedad Vascular Cerebral

La Organización Mundial de la Salud define a la enfermedad vascular cerebral (EVC) como un rápido desarrollo de signos clínicos de perturbación focal o global de la función cerebral con síntomas de causa vascular aparente; que pueden durar más de 24 horas y que durante este periodo pueden conducir a la muerte (WHO 1988; Truelsen T 2006). Es la segunda causa de muerte a nivel mundial (Murray and Lopez 1997) sólo superada por las cardiopatías isquémicas; en el año 2012 causó 6.7 millones de muertes lo que representó el 11.9% del total como se muestra en la Figura 1 (Feigin, Forouzanfar et al. 2014). Se estima que 1/6 de los seres humanos presentarán una EVC en algún momento de la vida (Seshadri, Beiser et al. 2006), que la letalidad es del 20-30% (Warlow 1998; Dirnagl, Iadecola et al. 1999) y que aproximadamente cada 12 minutos alguien muere a causa de la EVC por lo que se destina cerca de 6% del presupuesto mundial a la salud únicamente a esta enfermedad (Durukan and Tatlisumak 2007).

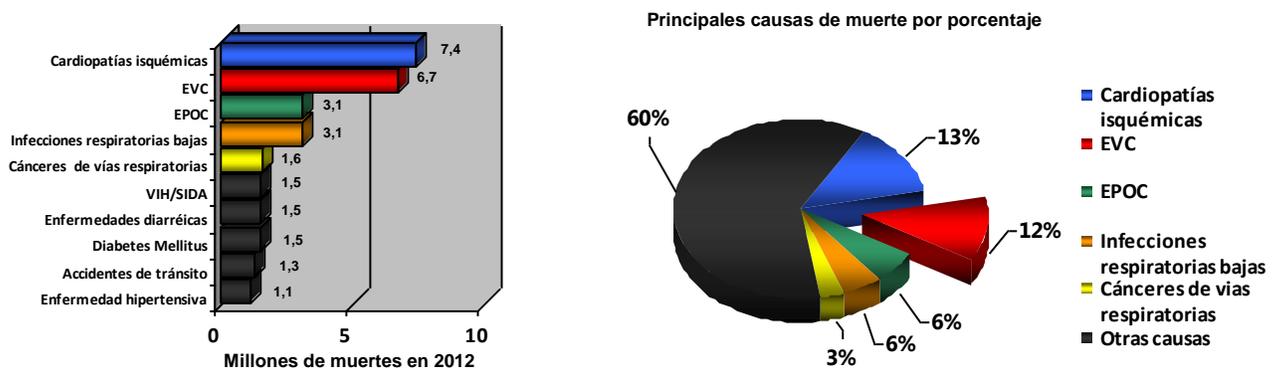


Fig. 1. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2012. (Modificado de WHO)

Epidemiología; morbilidad y mortalidad

La EVC es una patología que genera discapacidad transitoria y permanente. De 1990 a 2010 pasó de ser la quinta a la tercer causa de incapacidad a nivel mundial **(Murray, Vos et al. 2012)** y se estima que existe una tendencia de aumento hacia el 2020 **(Murray and Lopez 1997)**. Dentro de los 6 primeros meses luego de la EVC la sexta parte de los pacientes requerirán ayuda para la realización de sus actividades cotidianas **(Warlow 1998)**. Se sabe que existe un aumento proporcional de la incidencia de la EVC con el envejecimiento llegando a ser la primer causa de discapacidad en adultos mayores (≥ 65 años) **(WHO 1988; Warlow 1998)**. Sin embargo, cada vez se presentan más casos en la población en edad productiva (15-64 años) **(Chiquete E 2012)**.

Por otro lado, se ha descrito una relación directa del número de muertes por EVC con el grado de desarrollo de los países; en un estudio multicéntrico sobre casos incidentes de EVC comprendidos entre 1970 y 2008 se observó un decremento del 42% en los países desarrollados y un aumento del 100% en países de bajo a mediano desarrollo **(Feigin, Lawes et al. 2009)**. Esto se debe en gran parte al avance tecnológico de los servicios de salud, número de empleados sanitarios y a la disminución de los factores de riesgo, que en general son los mismos que los cardiovasculares; tabaquismo, diabetes mellitus, obesidad e hipertensión arterial. **(Warlow 1998; Kolominsky-Rabas, Weber et al. 2001)**.

En México, según cifras del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática; la EVC ocupó la sexta causa de muerte con 31,997 muertes lo que representó el 54.22 % del total de defunciones durante el año 2013 **(INEGI 2013)**. Es evidente, la gran importancia sanitaria de esta enfermedad tanto a nivel mundial como nacional.

Clasificación del EVC

Son dos los tipos de alteraciones que puede presentar un vaso sanguíneo cerebral para producir una EVC, la ruptura o la oclusión como se aprecia en la Figura 2. La ruptura (no traumática) que generalmente es precedida por aneurismas y/o hipertensión arterial provoca hemorragia, si ésta no es detenida por hemostasis se produce una extravasación masiva de sangre y dependiendo de la zona donde se presente se clasifica en hemorragia intracerebral con 2/3 partes del total de los eventos (puede ser intraparenquimatosa o intraventricular), o hemorragia subaracnoidea con 1/3 (**Sudlow CL 1997**).

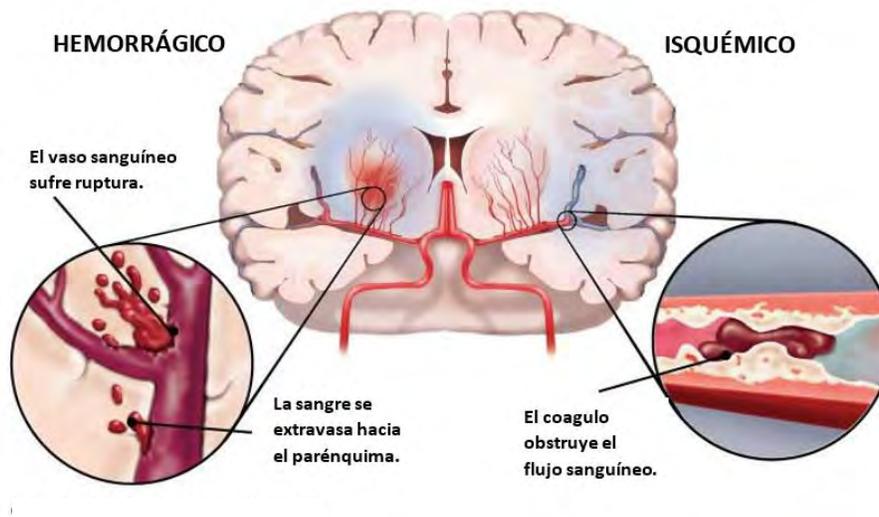


Fig. 2. Tipos de EVC por causa. (Modificado de Heart and Stroke Foundation of Canada <http://www.heartandstroke.com/site/c.iklQLcMWJtE/b.3483933/>)

La oclusión puede deberse a la obstrucción del lumen vascular por un coágulo sanguíneo, que puede ser de dos tipos: trombo o émbolo. El trombo es un cuerpo sólido que se forma al coagularse la sangre y obstruir el flujo sanguíneo cerebral (FSC) generalmente debido a problemas con los factores de coagulación o por densas placas de ateroma. Cuando se forma un trombo en un lugar alejado del cerebro (corazón, extremidades, etc.) puede desprenderse todo o una parte de éste, y circular hasta la vasculatura cerebral donde puede formar un tapón oclusivo disminuyendo parcial o totalmente el FSC. En este caso el coágulo es un émbolo

sanguíneo, sin embargo, existen otros tipos de émbolos no sanguíneos (sépticos, aéreos, tisulares, grasos, etc.) que también pueden producir oclusión (Figura 3) (Lee, Betz et al. 1996).

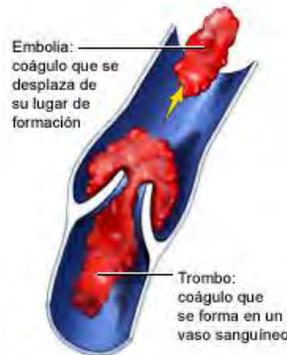


Fig. 3. Tipos de coágulos sanguíneos oclusivos. (Modificado de Medline Plus https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18120.htm)

A esta disminución del aporte sanguíneo al cerebro se le conoce como isquemia cerebral que posteriormente puede llegar a producir un infarto. Sin embargo, si la oclusión es momentánea y los síntomas desaparecen en menos de 24 horas, no se presenta infarto ni secuelas, a esta oclusión no permanente se le denomina ataque isquémico transitorio (Albers, Caplan et al. 2002). La EVC de etiología isquémica es la más frecuente ya que representa el 85% (Durukan and Tatlisumak 2007) del total de casos; se clasifica por su causa en: aterotrombóticos, cardioembólicos y lacunares (pequeños infartos subcorticales <15 mm de diámetro, que representan el 25% del total de EVC isquémicos) como se aprecia en el cuadro de la Figura 4. (Sacco, Marini et al. 2006; Bejot, Catteau et al. 2008). Cuando se presenta un paro cardiorespiratorio que conlleve a la hipovolemia puede presentarse isquemia sin oclusión directa de la vasculatura cerebral, en este caso se habla de una isquemia global ya que la afectación no es focalizada (MacManus, Buchan et al. 1993). En un estudio multicéntrico realizado en México en el año 2010 se encontró que después de 30 días de hospitalización las tasas de mortalidad son más elevadas para los tipos hemorrágicos: Intracerebral 33.6% y subaracnoidea 29.3%, en comparación con 13.9% para la EVC isquémica (Chiquete E 2012). Con esto,

se concluye que pese a que la EVC isquémica es la más frecuente, es la menos letal, por lo cual los esfuerzos se han centrado en favorecer la recuperación tras el daño.

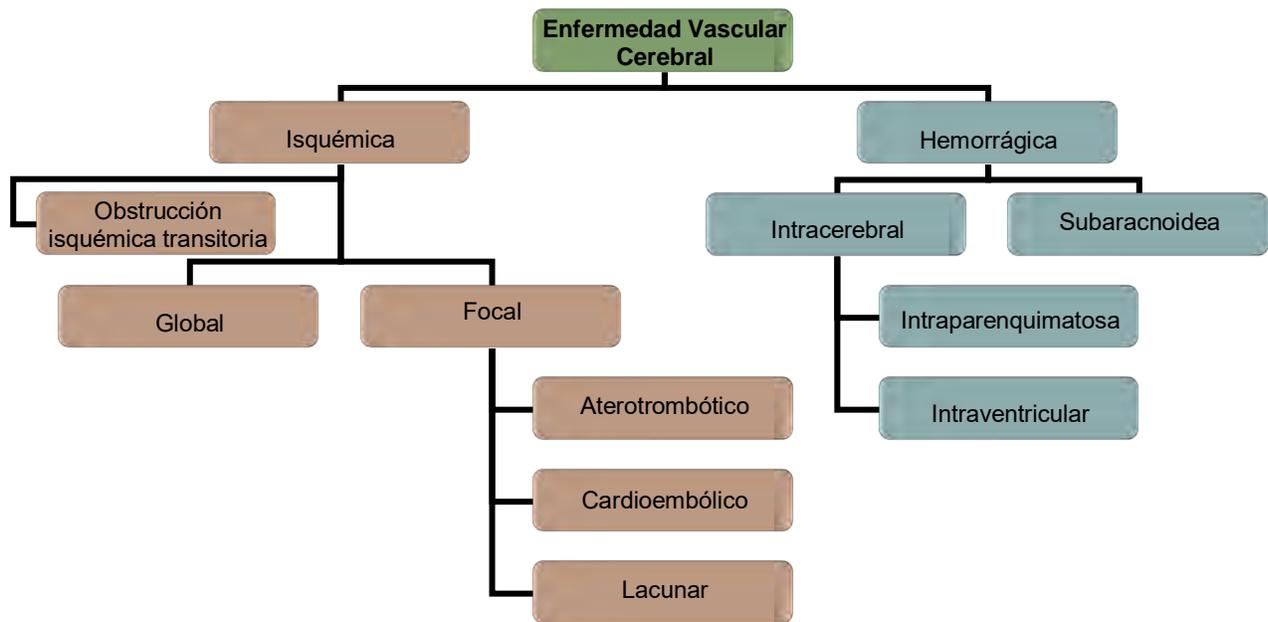


Fig. 4. Clasificación por subtipos de la EVC. Modificado de (E. Díez-Tejedor 2001)

Fisiopatología de la isquemia cerebral

El cerebro es un órgano particularmente sensible a la isquemia, pues se ha reportado que con una interrupción absoluta del FSC de tan sólo 5 minutos comienzan a morir ciertos tipos neuronales como las hipocampales del área CA1, a diferencia de miocitos cardiacos o hepatocitos que requieren de 20 a 40 minutos de isquemia para comenzar a morir (Lee, Grabb et al. 2000). En el EVC isquémico ocasionado por trombosis, embolismo o hipoperfusión sistémica, la disminución en la perfusión sanguínea implica disminución en el aporte de oxígeno (hipoxia), glucosa (hipoglucemia) y otros nutrientes como agua, hormonas, electrolitos, vitaminas, etc. (Agani and Jiang 2013). Esta afectación presenta un patrón de daño

gradual en el parénquima cerebral donde se identifican 3 zonas con diferentes niveles de afectación: una zona central de hipoperfusión de FSC que se conoce como foco isquémico donde la perfusión se encuentra a tasas menores de $10 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, otra zona de daño parcial periférica al núcleo con tasas de perfusión de 10 a $20 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ conocida como penumbra isquémica, y circundante a la penumbra; el parénquima cerebral sin daños por la isquemia con tasas de perfusión de FSC mayores a $20 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (**Hossmann 1994; Castillo and Rodriguez 2004**)

Isquemia y zonas del infarto

La zona de penumbra está en la periferia del foco isquémico y a diferencia de éste es una zona potencialmente rescatable donde a pesar de que hay hipoxia e hipoglucemia, las células presentan alteraciones funcionales pero no morfológicas que comprometen su viabilidad. En el tiempo subsecuente, parte de la penumbra evolucionará hacia tejido sano (oligopenumbra) aunque la mayor parte puede convertirse en foco isquémico si no se reestablece la reperfusion sanguínea en los días subsecuentes a la isquemia (Figura 5). (**Dirnagl, Iadecola et al. 1999; Miriam Marañón Cardonne 2014**).

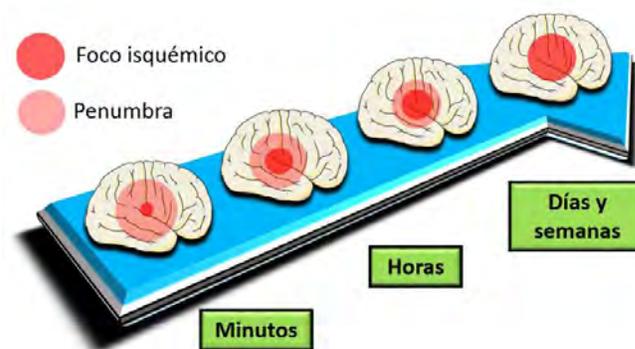


Fig. 5. Evolución temporal del EVC Isquémico. Modificado de (Dirnagl, Iadecola et al. 1999)

Cascada isquémica (aspectos bioquímicos)

Al conjunto de todos los procesos celulares y moleculares que ocurren a partir de la oclusión de un vaso sanguíneo cerebral se les conoce como cascada isquémica, actualmente no están del todo claro los mecanismos que se desencadenan, ni cómo interactúan entre sí, pero se han identificado dos procesos encabezados por distintos tipos de muerte celular; la necrosis y la apoptosis (**Arango-Davila, Escobar-Betancourt et al. 2004**). La muerte por necrosis suele ser súbita y se presenta en la fase aguda de la isquemia cerebral, en tanto que la muerte por apoptosis se presenta en la fase crónica e incluso en la reperfundión de las horas y días subsecuentes (Figura 6) (**Beilharz, Williams et al. 1995**).

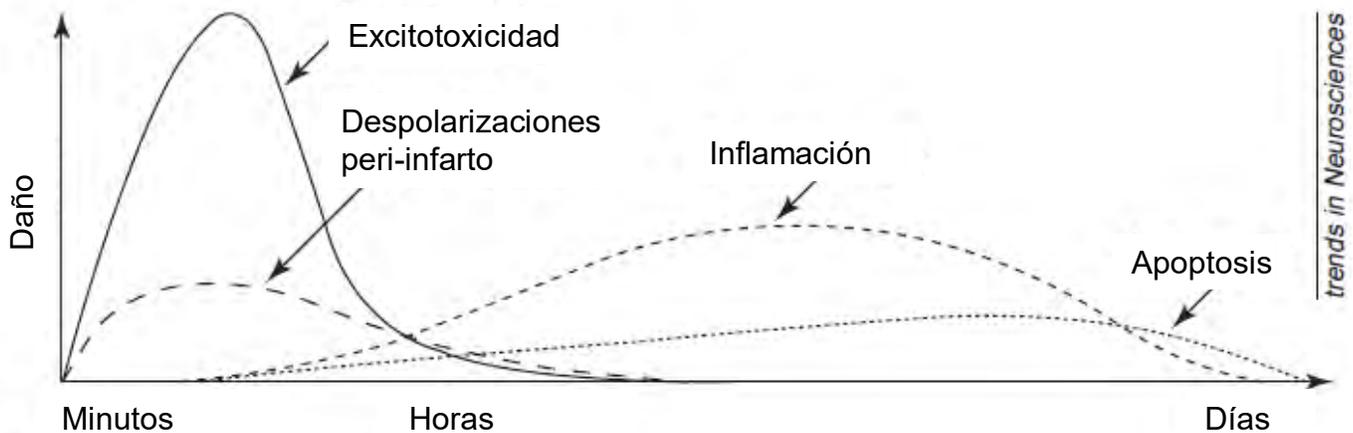


Fig. 6. Eventos dañinos de la isquemia a través del tiempo. Modificado de (Dirnagl, Iadecola et al. 1999)

Estos eventos que comienzan por el decremento del FSC causan una disminución en el aporte de oxígeno y glucosa necesarios para mantener el metabolismo celular cerebral, y dado que las neuronas no cuentan con reservorios energéticos, la falta de sustratos merma inmediatamente su funcionamiento. Con la disminución de oxígeno, la glucólisis se realiza por la vía anaeróbica, la cual produce ácido láctico a partir de piruvato que acidifica el entorno celular, esta disminución en el pH provoca que el calcio unido a proteínas se libere aumentando su concentración intracelular. (**Arango-Davila, Escobar-Betancourt et al. 2004**). Por otro lado, el O₂

es el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que en condiciones de hipoxia existe un fallo en la producción de ATP necesario para el funcionamiento antiporte de la ATPasa de Na^+/K^+ y de expulsión de Ca^{2+} intracelular, afectándose la homeostasis iónica de la célula. La disfunción de la ATPasa de Na^+/K^+ provoca que los iones que transporta sigan gradientes de concentración aumentando el K^+ extracelular y el Na^+ intracelular ocasionando que se pierda el potencial membranar (-70 mV) despolarizando a la célula **(Beilharz, Williams et al. 1995)**.

Excitotoxicidad

La despolarización anóxica causa la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje que provoca un influjo de Ca^{2+} del medio extracelular (10,000 veces mayor) al interior de la célula **(Chin and Means 2000)**, esto provoca un aumento en la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana y causa la liberación de neurotransmisores contenidos en estas vesículas por exocitosis, como el glutamato, que es el aminoácido excitador más abundante del cerebro. Una vez en el espacio sináptico en condiciones fisiológicas; los niveles de glutamato disminuyen por mecanismos de recaptura dependientes de ATP convirtiéndose en glutamina en el interior de los astrocitos. Éste proceso está afectado después de la hipoxia **(Lee, Grabb et al. 2000)** donde hay una consecuente elevación de la concentración extracelular de glutamato que puede llegar a producir excitotoxicidad (toxicidad por excitación). El glutamato puede actuar sobre 2 familias de receptores; metabotrópicos e ionotrópicos, se clasifican 3 de estos últimos por sus agonistas farmacológicos: ácido kaínico, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) **(Dirnagl, Iadecola et al. 1999)**. El receptor NMDA (NMDAR) es un canal iónico no selectivo para Na^+ y Ca^{2+} que se encuentra bloqueado por un ion Mg^{2+} , en la isquemia al despolarizarse la membrana, y por la acidosis previamente instaurada, éste se desplaza y permite el libre influjo de cationes y el aumento de calcio intracelular provoca la liberación de más calcio del retículo endoplásmico a través de receptores de rianodina (principalmente el tipo R2 y R3) **(Zucchi and Ronca-Testoni 1997)** Esto promueve la liberación de aún más

calcio en un fenómeno que se conoce como liberación de calcio inducida por calcio **(Chin and Means 2000)** el cual a su vez se une a calmodulina, una importante proteína intracelular encargada de la regulación de numerosas enzimas proteolíticas cascada abajo. La liberación excesiva de calcio exacerba el daño inicial de la despolarización **(Martinez-Estrada, Rodriguez-Millan et al. 2003)**.

Generación de especies reactivas

La activación enzimática por excitotoxicidad provoca la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) que produce óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina, que al unirse con el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) resultante de la ganancia de un electrón de la cadena respiratoria en la molécula del O_2 , forma peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual se descompone en dióxido de nitrógeno (NO_2) y en radical hidroxilo (HO^{\bullet}) que es un importante oxidante de membranas celulares mediante mecanismos de lipoperoxidación **(Diane 1997)**.

Respuestas moleculares a la isquemia

La generación de radicales libres junto con la acción de factores proapoptóticos como BAK (del inglés Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) homologous antagonist/killer), BAD (del inglés Bcl-2-associated death promoter), BAX (del inglés Bcl-2 associated X protein), PUMA (modulador de apoptosis regulado por p53), y NOXA (proteína de la misma familia) etc. **(Rehncrona, Mela et al. 1979)** favorecen la formación del mPTP (poro de permeabilidad de transición mitocondrial) por donde se da la liberación del citocromo c, Smac/DIABLO (del inglés second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI) y el AIF (factor inductor de apoptosis) que se encuentran dentro de la mitocondria, además de alterar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). El citocromo c cumple funciones energéticas en el interior mitocondrial, pero una vez fuera de esta, se une a APAF-1 (del inglés apoptosis protease-activating factor-1) y recluta a la procaspasa-9 activándola en presencia de la HSP70 (del inglés 70 KDa heat shock protein)

(Ravagnan, Gurbuxani et al. 2001) a caspasa-9; ambas forman el apoptosoma. Este complejo proteico activa a la procaspasa-3 y junto con las otras caspasas efectoras (6 y 9) las proteínas antiapoptóticas Bcl-XL (del inglés B-cell lymphoma-extra large) y Bcl-2 son inactivadas **(Cao, Luo et al. 2002)**. La caspasa-3 induce la proteólisis del ICAD (inhibidor de caspasa activada de ADN) el cual ya no puede detener la acción de CAD (caspasa activada de ADN) que se trasloca al núcleo y produce la fragmentación enzimática de los nucleosomas que contienen al DNA. **(Tominaga, Kure et al. 1993; Enari, Sakahira et al. 1998)**. El aumento intracelular de calcio también ocasiona la activación enzimática de la PLA₂ (fosfolipasa A2) que se encarga de actuar sobre el enlace éster del ácido araquidónico para que las enzimas lipo-oxigenasa (LOX) y ciclo-oxigenasa (COX) sinteticen eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos los cuales contribuyen a la neuroinflamación mediante la IL-6 e IL-8 (interleucina 6 y 8) **(Saito, Suyama et al. 1996)**.

Otra de las enzimas sobreactivadas por las altas concentraciones de calcio intracelular es la fosfolipasa C gama (PLC γ) que se encarga de la hidrólisis de fosfolípidos membranales (PIP₂) éste produce fosfatidilinositol 3 (IP₃) que se une a su receptor en el retículo endoplásmico y promueve la liberación de aún más calcio al medio intracelular. También se produce diacilglicerol (DAG) que junto con el Ca²⁺ promueven la actividad de fosfocinasa C (PKC).

Regulación transcripcional en respuesta a la isquemia

Durante la isquemia el factor inducible por hipoxia, del inglés hipoxia-inducible factor 1 (HIF1- α) también se regula por el factor nuclear de cadenas kappa ligeras de células B activadas (NF- κ B) a nivel postranscripcional. En condiciones fisiológicas (normoxia) se mantienen niveles relativamente bajos de HIF1- α por acción de las proil hidroxilasas (PHD's) mediante un mecanismo dependiente de hierro y oxígeno que induce su posterior ubiquitinación y degradación proteosomal. Durante la cascada isquémica la hipoxia es el principal disparador de la respuesta

de HIF, pues la hidroxilación en los residuos de prolina no se lleva a cabo, lo que aumenta los niveles de HIF1- α que se acopla a HIF1- β (traslocador nuclear), éste heterodímero ya en el núcleo es un importante factor de transcripción que regula la expresión de más de 100 genes, entre ellos el del VEGF, siendo su principal activador en la isquemia **(Krohn, Link et al. 2008)**.

Alteraciones en la Barrera Hemato Encefálica (BHE)

El cerebro es un órgano inmunológicamente privilegiado que cuenta con características especiales en su vasculatura. La irrigación sanguínea a nivel cerebral, tiene lugar en un microambiente muy controlado compuesto por neuronas, células endoteliales, astrocitos y pericitos que se conoce como unidad neurovascular (Figura 7). Este endotelio vascular cerebral es diferente a los de otros órganos en su composición y comportamiento **(Lok, Gupta et al. 2007)**.

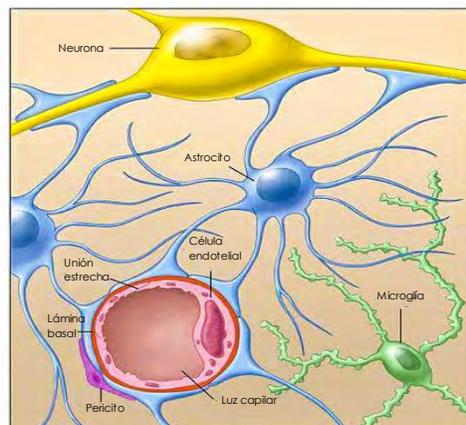


Fig. 7. Componentes de la unión neurovascular. Tomado de (Hallenbeck, Del Zoppo et al. 2006)

Las células endoteliales que lo componen presentan:

- * Uniones estrechas en su cara lateral.
- * Una membrana basal más gruesa formada por laminina-1,-2,-4 y -5 y colágeno IV.
- * Nivel elevado de resistencia eléctrica transendotelial.
- * Tasas bajas de transición y transporte paracelular en normoxia.
- * Elevado número de mitocondrias asociado a su alta actividad metabólica.
- * Su citoplasma no presenta las fenestraciones que tienen otros capilares del cuerpo de mayor permeabilidad.
- * Expresión polarizada de receptores en sus membranas basolateral y apical para regular selectivamente el paso de sustancias (moléculas, iones) e incluso células a través de estas. **(Nakagomi, Kubo et al. 2015)**

Las uniones estrechas hacen de los capilares cerebrales estructuras muy reguladas, volviendo a las células endoteliales más cercanas entre sí y menos permeables **(Abbott, Ronnback et al. 2006)**.

Estas uniones forman un entramado proteínico con forma de cierre que le confiere a la BHE su función impermeable. Al conjunto de estas uniones estrechas u oclusoras, también se le conoce como zonula occludens. La proteína ZO-1 de 225 KDa asociada al lado citoplasmático de la membrana se expresa en el endotelio de la BHE **(Morin-Brureau, Lebrun et al. 2011)** y se ha demostrado que a mayor fosforilación de la misma es mayor el grado de cierre de las uniones estrechas.

Su función es regular su fosforilación e interactuar con otros componentes del citoesqueleto. Además de ZO-1, se han identificado y caracterizado otras proteínas como la cingulina de 108 KDa; proteína membranal periférica, otras proteínas transmembranales muy importantes son la ocludina de 60 KDa que se une a ZO-1 y las claudinas; pequeñas proteínas de 20-24 KDa, siendo las 3, 5 y 12 las más abundantes en la BHE.

Dentro de las uniones adherentes se encuentran las cadherinas de 120 a 140 KDa proteínas transmembranales que son moléculas de adhesión dependientes de calcio y que están bien caracterizadas por su interacción con las cadenas de actina que forman el citoesqueleto y molécula de adhesión plaquetoendotelial-1 (PECAM-1), glicoproteína trasmembranal de 130-140 KDa que se encuentra fuertemente expresada en células endoteliales como se aprecia en la Figura 8. **(Posada-Duque, Barreto et al. 2014).**

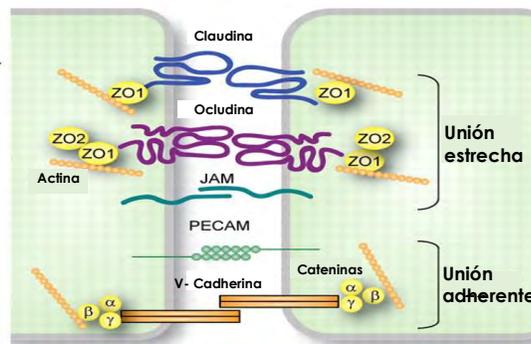


Fig. 8. Componentes la Zonula Ocluddens (Tomado de <http://www.neurology.org/content/78/16/1268>)

Tras la isquemia en la zona de penumbra, la microglia activada comienza a liberar citocinas y moléculas de adhesión, en el transcurso de horas a días se incrementan los procesos angiogénicos, y tras días, semanas y meses los astrocitos sobreexpresan proteína gliofibrilar ácida favoreciendo la cicatrización glial además

de un aumento en la expresión de acuoporina 1 y 4 que exacerban el edema vasogénico. **(Dirnagl, Iadecola et al. 1999)**

La permeabilidad selectiva de la BHE es muy importante para el correcto funcionamiento del encéfalo, pues por un lado permite la entrada de oxígeno y glucosa, entre otros nutrientes, y por otro, evita la entrada de sustancias tóxicas y agentes patogénicos. Cuando la glucosa se encuentra disuelta en el torrente sanguíneo logra atravesar la BHE por transporte activo.

El oxígeno, el anhídrido carbónico, y el alcohol etílico son ejemplos de sustancias que también penetran la BHE, pero éstas a diferencia de la glucosa, lo hacen por difusión pasiva. Esta permeabilidad altamente selectiva y controlada se ve afectada en procesos isquémicos, por la liberación de matriz metaloproteinasas (MMP) especialmente la MMP-9 a partir polimorfonucleares que logran filtrarse por diapedesis de la vasculatura periférica **(Morin-Brureau, Lebrun et al. 2011)**.

Esta La MMP-9, tiene como función principal degradar las uniones estrechas que constituyen la BHE, ocasionando interrupciones en las proteínas que le confieren integridad a la barrera, y de esta manera el edema empeora en la fase crónica postisquémica **(Bauer, Burgers et al. 2010)**

El complejo proceso de la cascada isquémica y las vías moleculares que ésta implica esta interrelacionada con otros procesos como son: permeabilidad de la BHE, excitotoxicidad glutamatérgica, neuroinflamación, necrosis, apoptosis intrínseca, aumento de la concentración de calcio intracelular, etc. Y cada uno activa a su vez otras reacciones endógenas, lo que exagera el daño inicial ocasionado por la oclusión capilar. En la Figura 9. se abordan estos procesos de forma más detallada.

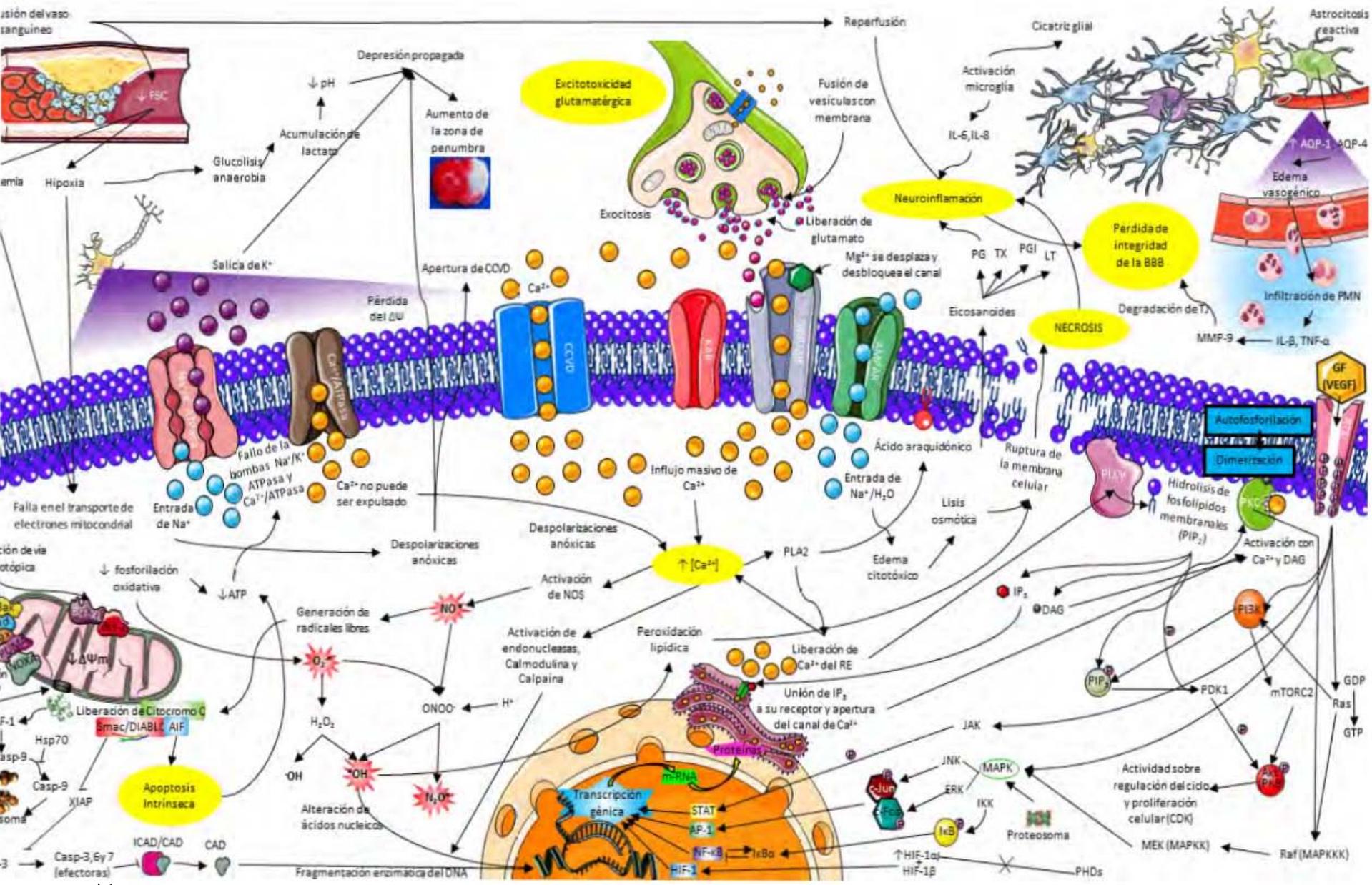


Fig. 9. Principales mecanismos celulares y moleculares implicados en la fisiopatología de la isquemia cerebral (Modificado de (Warlow 1998; Dirnagl, Iadecola et al. 1999))

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

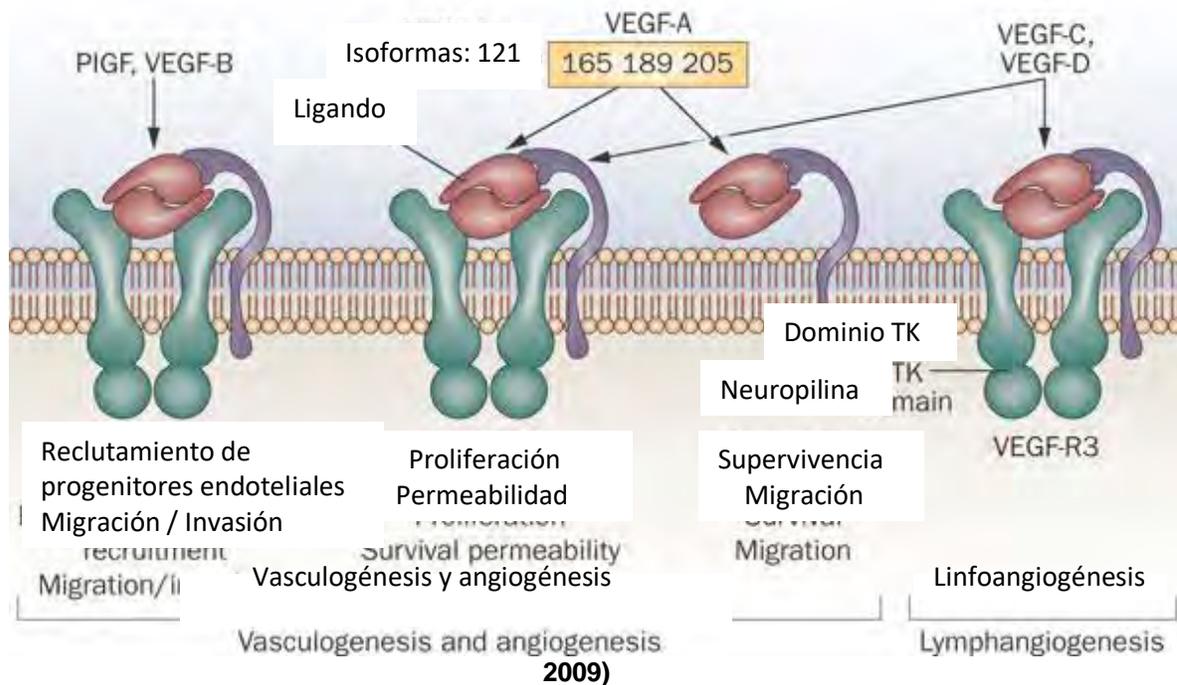
El VEGF es una glicoproteína y factor de crecimiento con una importante actividad durante la vasculogénesis embrionaria y en el organismo maduro (angiogénesis) **(Sun, Jin et al. 2003)**, también se encuentra asociado a angiogénesis patológica como ocurre con el crecimiento de tumores malignos **(Ogunshola, Stewart et al. 2000)**. Otras moléculas implicadas en la regulación positiva de la angiogénesis son el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoyetinas 1 y 2 e interleucina-8 **(Herrera 2006)**

Existen 6 miembros en la familia del VEGF; A, B, C, D, E y PlGF; cuando se habla de VEGF, comúnmente se hace referencia al VEGF A de 45 KDa, involucrado principalmente en la formación de vasos nuevos, mientras que los miembros C y D están implicados en linfangiogénesis (formación de vasos del sistema linfático) **(Ma, Zechariah et al. 2012)**.

En el humano el gen que codifica para el VEGF presenta 8 exones y 7 intrones, por lo que puede presentar diferentes isoformas de acuerdo a los exones que se hayan eliminado de la secuencia de mRNA y al número de aminoácidos que conforma a la proteína funcional (*splicing* alternativo) que pueden generar diferentes formas de *splicing*; VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₁₈₉ y VEGF-A₂₀₆, presentando estas diferentes masa molecular y propiedades biológicas. La isoforma más abundante es VEGF-A₁₆₅ y las menos comunes son el VEGF-A₁₄₅ y el VEGF-A₁₈₃ **(Ferrara, Gerber et al. 2003)**. Todas las isoformas de VEGF pueden actuar sobre sus receptores de tirosin cinasa (RTKs por sus siglas en inglés); RTKs; VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Fik-1) y VEGFR-3 (Flt-4) y algunas se pueden unir a los co-receptores de neuropilina **(Grothey and Galanis 2009)**. VEGF-A₁₆₅ se encuentra cargado positivamente y se une a la heparina, actúa sobre VEGFR1 y VEGFR2, pero las funciones de la activación del VEGFR1 aún no han sido bien estudiadas, **(Kliche and Waltenberger 2001)** y actualmente se piensa que su

principal función es la de competir con VEGFR2 por el ligando (Figura 10). (Ma, Zechariah et al. 2012) El VEGF-A₁₆₅ presenta mayor afinidad al VEGFR2, aunque también puede unirse a la neuropilina-1 incrementando la afinidad por este. (Neufeld, Kessler et al. 2002)

Fig. 10. Receptores de VEGF, ligandos y sus efectos. Tomado de (Grothey and Galanis



Tras la unión del VEGF-A al VEGFR2 éste se autofosforila y comienza una serie de fosforilaciones y señalizaciones cascada debajo de diferentes vías como protein- cinasas activadas por mitogenos, fosfoinositol 3 quinasa, proteína cinasa C gamma, sintasa de óxido nítrico endotelial y diana de rapamicina de células de mamífero; (MAPK, PI3K, PKC y eNOS y mTOR por sus siglas en inglés respectivamente) que están involucradas en mecanismos de proliferación, angiogénesis, neuroprotección, etc (Ferrara, Gerber et al. 2003; Ma, Zechariah et al. 2012).

También se ha descrito la polarización en la distribución de los receptores de VEGF en la vasculatura cerebral, encontrándose mayor abundancia y actividad del VEGFR1 en el lado apical-luminal, y del VGFR2 en el lado basal/abluminal, así

como mayor afinidad del ligando hacia los homodímeros de cada receptor como se aprecia en la Figura 11. (Hudson, Powner et al. 2014).

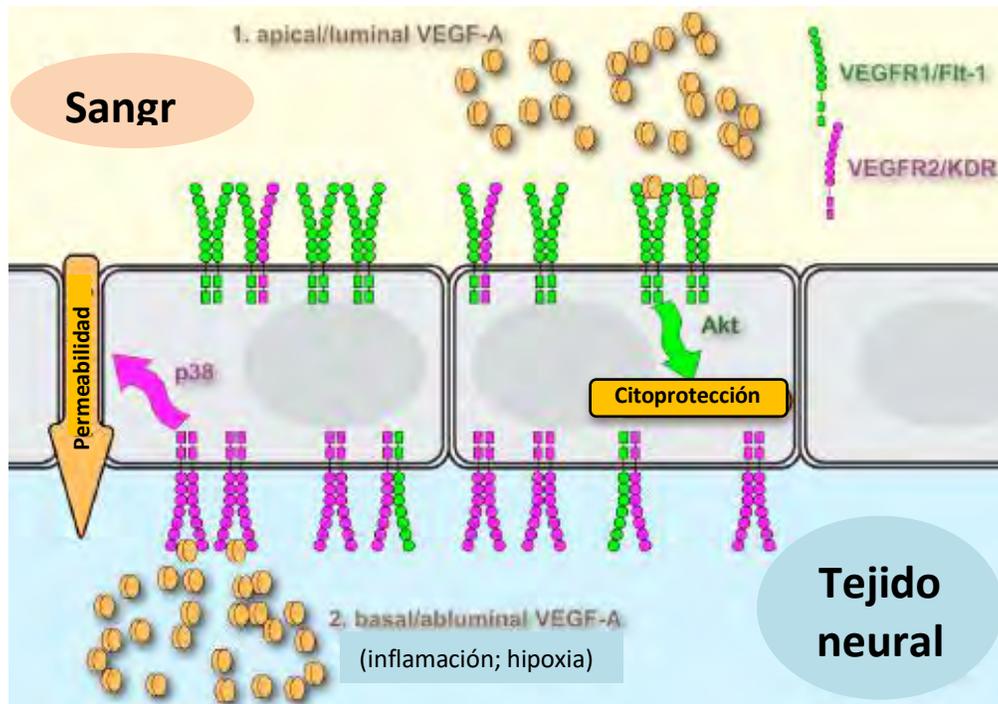


Fig. 11. Polarización de los receptores de VEGF en el endotelio vascular cerebral. Tomado de (Hudson, Powner et al. 2014)

En condiciones de hipoxia se aumenta la cantidad del VEGF que puede favorecer la neuroprotección debido probablemente a la generación de nueva vasculatura cerebral. Sin embargo, esta vasculatura no es totalmente funcional, pues presenta la característica de ser altamente permeable (Wang, Kilic et al. 2005) ya que se ha demostrado que el VEGF actúa sobre la permeabilidad vascular (Martinez-Estrada, Rodriguez-Millan et al. 2003; Jiang, Xia et al. 2014), e induce neuroprotección y neurogénesis (Sun, Jin et al. 2003; Ma, Zechariah et al. 2012). También, el VEGF favorece el crecimiento axonal y la supervivencia celular en cultivos neuronales (Wang, Guo et al. 2007). Diversos tipos celulares producen VEGF durante la isquemia, incluso se ha reportado que en condiciones de estrés los mismos pericitos liberan VEGF al medio, sin embargo el principal tipo celular

que lo sintetiza y libera en el cerebro son las células endoteliales de la microvasculatura **(Bai, Zhu et al. 2015)**.

Se ha identificado que uno de los mecanismos por los cuales VEGF induce neuroprotección en el daño cerebral por isquemia es mediante la disminución en la actividad de caspasa-3, la inhibición de la fosforilación del canal de potasio y decremento de las corrientes de este catión **(Wang, Guo et al. 2007)**, la activación de la vía (PI3K/Akt) **(Chen, Xiong et al. 2012)** al promover a HIF-1 α de manera oxígeno-independiente **(Agani and Jiang 2013)**.

El VEGF es una glicoproteína y factor de crecimiento secretado de manera endógena originalmente descrito como factor de permeabilidad vascular **(Herrera 2006)**, y se sabe que está involucrado en procesos de vasculogénesis, angiogénesis, neurogénesis y neuroprotección **(Ferrara, Gerber et al. 2003)**. Luego del evento isquémico, el VEGF tiene un efecto dual en el organismo, por un lado la formación de vasculatura aberrante y sin barrera que exacerba la formación de edema, y por otro la neuroprotección mediante el bloqueo de la apoptosis y producción de estímulos de supervivencia que contrarrestan los efectos lesivos de la isquemia **(Sun, Jin et al. 2003)**.

Diseño experimental

Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)

Con el objetivo de estudiar la compleja fisiopatología de la isquemia cerebral se ha buscado reproducir tal fenómeno en cultivos *in vitro* de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, y células endoteliales al aplicarles condiciones de privación de O₂ y glucosa. Sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede generalizar la

respuesta del organismo, por lo que también se ha buscado inducir la isquemia en animales de experimentación, los primates no humanos son los más adecuados en términos de evaluación neurológica debido a su parecido anatómico con el humano y en cuanto a integración sensomotora y comportamiento, pero el uso de rata de laboratorio es el modelo más empleado debido a su costo relativamente bajo y facilidad en reproducibilidad y mantenimiento (Rousselet, Kriz et al. 2012). Para producir isquemia global se utiliza la oclusión carótida bilateral (Speetzen, Endres et al. 2013) pero para el estudio *in vivo* de la isquemia focal transitoria, el método más empleado es la cirugía de MCAO (Shiraishi and Simon 1989) la cual consiste en la introducción de un filamento a través de la arteria carótida común hasta el origen de la Arteria Cerebral Media (MCA, por sus siglas en inglés). Figura 12. (Ansari, Azari et al. 2011).

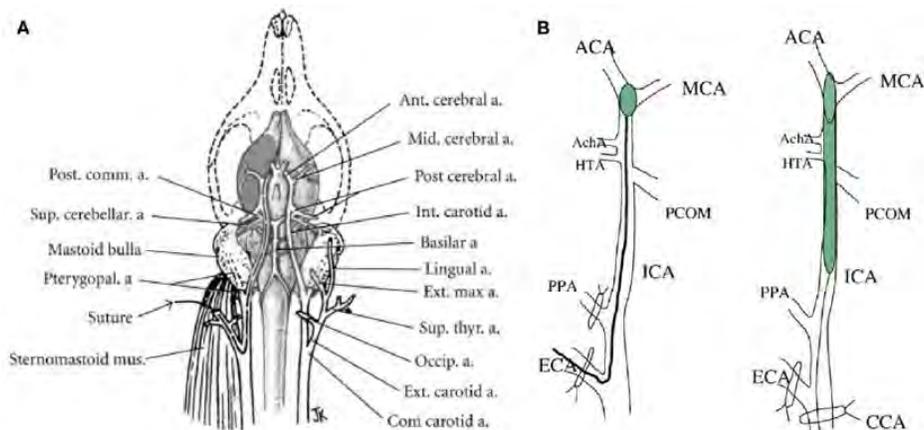


Fig. 12. A) Anatomía Vascular Cerebral de la rata. B) Introducción del monofilamento, por la arteria carótida externa (Longa, Weinstein et al. 1989) o por la arteria carótida común (Koizumi J 1986) hacia el origen de la arteria cerebral media para inducir isquemia.

ACA: Arteria Carotida Anterior, MCA: Arteria Cerebral Media, ECA: Arteria Carótida Externa, ICA: Arteria Carótida Interna, PCOM: Arteria Carótida Postcomún, PPA: Arteria PteroPalatina. Tomado de (Canazza, Minati et al. 2014)

Esta arteria se encuentra principalmente implicada en el infarto isquémico e irriga al lóbulo frontal, parietal y temporal. Su oclusión presenta afectaciones en la corteza, el estriado, el cuerpo caloso y el hipocampo, como se puede apreciar en la Figura 13.

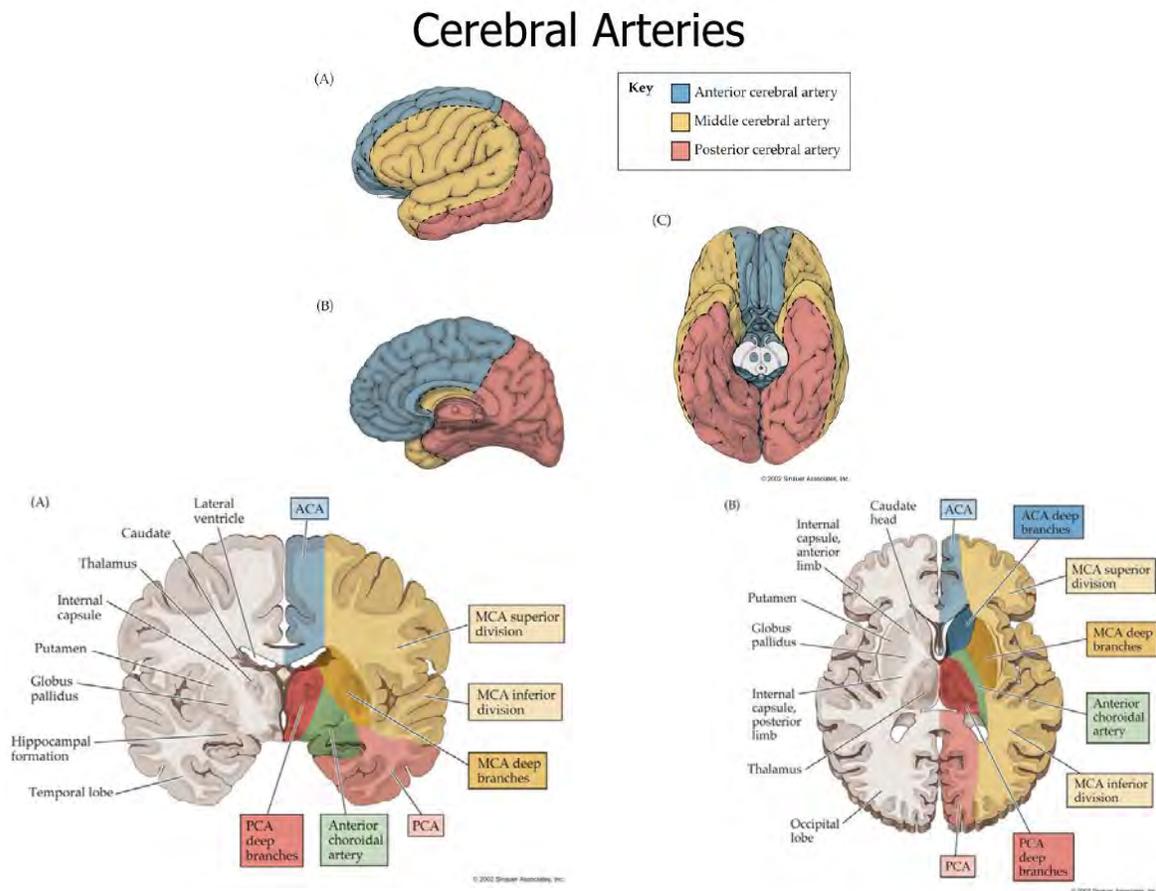


Fig. 13. Porciones del cerebro humano irrigadas por la MCA. Tomado de (Blumenfeld 2010)

Reacción de reducción del TTC

Aunque algunas de las técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones y la resonancia magnética funcional se utilizan en investigación básica

en modelos experimentales murinos, el método de tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazoilo (TTC) es quizá el más empleado debido a su facilidad, bajo costo y alta precisión al momento de delimitar la zona de infarto (**Lundy, Solik et al. 1986**). El TTC es un compuesto de color blanco ligeramente amarillento con peso molecular de 334.8 g/mol, foto- y termo-sensible, es una sal altamente hidrosoluble lo cual facilita su preparación y penetración en los tejidos, se emplea como indicador redox en experimentos bioquímicos para evaluar viabilidad celular, es muy útil para identificar respiración celular y por ende se utiliza para teñir aquellas células metabólicamente activas, en este caso neuronas y glía (**Isayama, Pitts et al. 1991**).

El fundamento de esta técnica es la reducción del TTC a un precipitado de sales de formazán de color rojo en la cadena respiratoria mitocondrial (transporte de electrones) que ocurre únicamente en el tejido metabólicamente activo del parénquima cerebral dejando sin teñir a las zonas metabólicamente silentes tras el daño (zona con disfunción mitocondrial). Figura 14. (**Bederson, Pitts et al. 1986**).

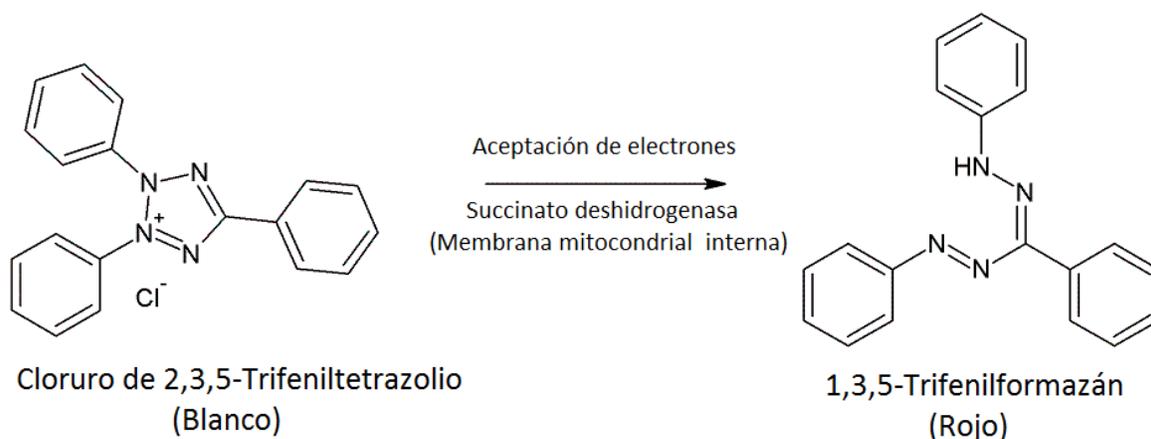


Fig. 14. Reacción de reducción del TTC. Modificado de (Zhang G 2014)

Sin embargo, esta técnica sólo es objetiva dentro de las primeras 48 horas luego de instaurada la isquemia, pues la permeabilidad selectiva de la BHE está afectada y esto causa la infiltración de células del sistema inmune (que son células metabólicamente activas), alterando los resultados de la prueba (**Liszcak, Hedley-Whyte et al. 1984**). De esta manera el TTC sirve para evaluar en qué áreas del cerebro existió un episodio isquémico y cuantificar el volumen del infarto.

Adicionalmente se realiza un procesamiento gráfico digital a las imágenes obtenidas de los cerebros teñidos con TTC con los cuales es posible realizar una aproximación cuantitativa del volumen del infarto (**Bederson, Pitts et al. 1986; Tureyen, Vemuganti et al. 2004**).

Tinción de Nissl

Cuando las neuronas se someten a la privación de oxígeno y nutrientes como en el caso de la isquemia sufren diversos cambios morfológicos, uno de los más relevantes es la degeneración de los ácidos nucleicos. Franz Nissl (1860-1919) desarrolló un método de tinción capaz de evaluar la presencia de DNA nuclear y de agrupaciones basófilas citoplasmáticas ricas en RNA donde se lleva a cabo la síntesis proteica (cuerpos de Nissl) en el retículo endoplásmico rugoso. En ciertas condiciones como en la cariólisis (fenómeno fisiopatológico caracterizado por la acción lítica de DNAsas sobre la cromatina) los cuerpos de Nissl pierden esta capacidad de unirse a colorantes acidófilos como el violeta de cresilo y no retienen el colorante, permaneciendo incoloros (**Ogunshola, Stewart et al. 2000**).

Nissl descubrió que con colorantes acidófilos como anilina, rojo neutro, azul de toluidina o violeta de cresilo se pueden marcar estas estructuras e indirectamente tener una estimación certera de la viabilidad neuronal (**Escarbajal 2006**). La tinción de Nissl ofrece un panorama general de la distribución, tamaño y morfología neuronal en el tejido nervioso, sin embargo no permite obtener información acerca de las ramificaciones de dichas neuronas pues por esta técnica no es posible observar al microscopio óptico los axones ni dendritas, los cuales pueden observarse mediante técnicas inmunohistoquímicas. Con la tinción de Nissl es posible observar y evaluar de manera objetiva la densidad neuronal así como la presencia de núcleos picnóticos (cromatina condensada) tras un episodio isquémico (**Lifshitz, Friberg et al. 2003**).

Método de Lowry y fluorescencia del azul de Evans

El colorante diazoico azul de Evans se utiliza *in vitro* para evaluar permeabilidad celular e *in vivo* para identificar fugas de proteína, ya que se fija a la albúmina y permite directamente evaluar la permeabilidad vascular **(Belayev, Busto et al. 1996)**.

La albúmina es la proteína plasmática más abundante (50% aproximadamente) por lo que es un buen indicador de la permeabilidad de la BHE **(Ujiie, Dickstein et al. 2003)**. Si el cerebro se encuentra teñido de color azul, se sugiere que existe fuga de proteínas debida a la alteración en la permeabilidad de la BHE pues en condiciones fisiológicas, la albúmina no atraviesa la barrera. Las uniones estrechas presentan un diámetro de aproximadamente 2 nm, permitiendo sólo el paso de moléculas pequeñas solubles en agua y la albúmina de 6 nm, pero en el caso donde hay alteración en su conformación las uniones estrechas pueden abrirse hasta 20 nm, permitiendo así el paso de la albúmina y otras moléculas circulantes **(Phinikaridou, Andia et al. 2012)**.

Tras un daño cerebral o inducción de la permeabilidad con agentes hiperosmóticos, un método para evaluar el grado de afectación en la vasculatura cerebral es la determinación espectrofluorométrica de la cantidad de azul de Evans permeado al parénquima cerebral. El azul de Evans tiene una longitud de onda de excitación a 620 nm y un pico de emisión a 680 nm, fluoresce en color rojo. Figura 15. **(Saria and Lundberg 1983; Ujiie, Dickstein et al. 2003)**.

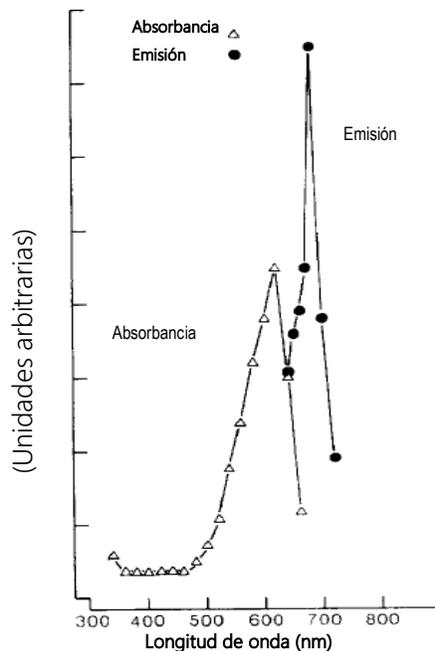


Fig. 15. Espectro de absorción y emisión del azul de Evans. Tomado de (Saria and Lundberg 1983)

Para realizar la determinación de la cantidad proteica existen diversos métodos como el ensayo de Bradford, método ácido bicinconínico, absorción UV directa, etc. El método de Lowry se fundamenta en dos reacciones: La reducción del Cu^{2+} a Cu^+ en un medio alcalino al quelarse con los enlaces peptídicos de las proteínas de la muestra produce una solución de color azul tenue y la intensificación de este color al reducirse el reactivo de Folin mediante el complejo cobre-proteína en un medio ácido. Figura 16. Este método es ampliamente usado para dicho fin dada su alta sensibilidad, que no requiere digestión previa y facilidad de realización y adaptación en el laboratorio. Sin embargo, tiene algunas desventajas como interferencias con agentes quelantes y reductores de cobre, presencia de ácidos y álcalis fuertes y concentración de triptófano y tirosina en la muestra, pues estos también reaccionan con el reactivo de Folin, reduciéndose (**Lowry, Rosebrough et al. 1951**).

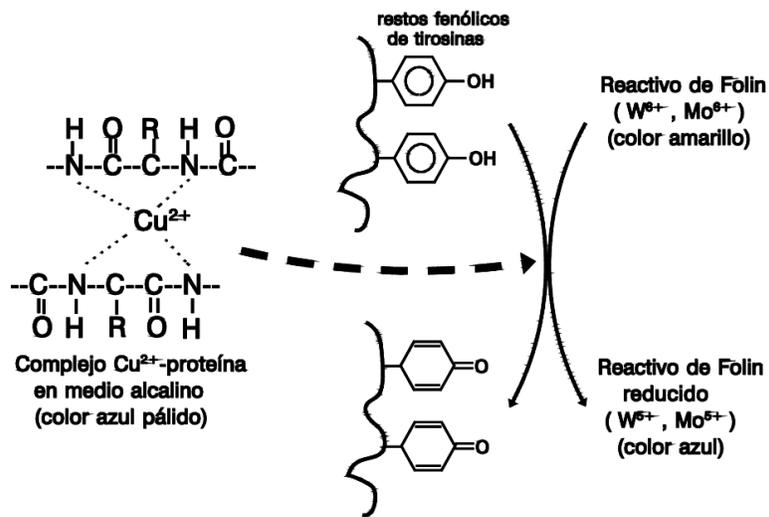


Fig. 16. Fundamento de la determinación proteica de Lowry. Tomado de <http://www2.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/practicas/Lowry.pdf>

Inmunohistofluorescencia

Un método muy utilizado en investigación para describir alteraciones celulares es el marcaje de estructuras proteicas intra- e inter-celulares. Esto se logra mediante el uso de anticuerpos específicos que se unen a proteínas indicadoras de lo que se desea estudiar (**Krause, Protze et al. 2015**). Se utiliza el marcaje de claudina-5 (**Goncalves, Ambrosio et al. 2013**) como indicadora de alteraciones en la microvasculatura y de PECAM-1 como marcaje de la vasculatura (**Ruffer and Gerke 2004; Krause, Protze et al. 2015**).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque se sabe que la expresión del VEGF aumenta después del infarto cerebral isquémico, no está bien entendido de qué manera su actividad dual sobre la permeabilidad de la BHE y la neuroprotección influye en el volumen de infarto producido después de la isquemia. Por tanto, es importante analizar el efecto de la administración exógena de VEGF recombinante y analizamos éstos en función de la dosis administrada.

HIPOTESIS

La administración de VEGF exógeno por vía intracerebroventricular en ratas con infarto cerebral inducido por MCAO transitoria, producirá efectos neuroprotectores de manera dosis dependiente.

OBJETIVOS

General

- Determinar los efectos de la administración de diferentes cantidades de VEGF exógeno sobre el volumen de infarto en un modelo experimental de isquemia focal transitoria.

Particulares

- Evaluar el volumen del infarto cerebral con diferentes cantidades de VEGF exógeno por el método de tinción *ex vivo* con TTC.
- Evaluar la viabilidad neuronal con diferentes cantidades de VEGF exógeno por el método de la tinción con violeta de cresilo.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente la permeabilidad de la BHE al marcador azul de Evans con diferentes cantidades de VEGF exógeno mediante microscopía de fluorescencia y espectrofluorometría como análisis de la función de la BHE.
- Evaluar la integridad estructural de cldn-5 y PECAM-1 como indicadores de la integridad de la BHE con diferentes cantidades de VEGF exógeno por medio de inmunohistofluorescencia.

METODOLOGÍA

Animales de experimentación

Se emplearon ratas adultas macho cepa Wistar con peso entre 270 y 320 g alimentadas *ad libitum* con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas sin entorno enriquecido.

Inducción de isquemia cerebral transitoria (cirugía MCAO)

Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por una Médica Veterinaria Zootecnista siguiendo los lineamientos de la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Investigación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Para la inducción de la isquemia, se anestesió al animal y se introdujo un monofilamento de nylon recubierto en la punta con silicón (Doccol, California, EUA) de 30 mm de largo y 0.37 mm en su parte más gruesa por vía intraluminal desde la arteria carótida externa (**Longa, Weinstein et al. 1989**) que se comunica con la arteria carótida interna hasta el origen de la MCA en el polígono de Willis con lo que la perfusión sanguínea cerebral en ese hemisferio se bloqueó por 90 minutos, después de los cuales el filamento fue removido para permitir la reperfusión durante 24 horas. (**Speetzen, Endres et al. 2013**) Para el grupo experimental del control de cirugía (sham) se realizó el mismo procedimiento quirúrgico, exceptuando la introducción del monofilamento ocluser.

Administración del tratamiento

La administración intracerebral de los diferentes tratamientos se llevó a cabo 30 min después de iniciada la reperfusión, mediante inyecciones intracerebroventriculares con las siguientes coordenadas estereotáxicas: anteroposterior (AP): -0.98 mm, lateral (L): 1.5 mm, y ventral (V): 4.0 mm y se realizó la administración del tratamiento mediante un microcapilar a una tasa de infusión de 1µL/min.

Obtención de tejido cerebral

Pasadas 24 horas del periodo de reperfusión, se administró azul de Evans por vía intravenosa a través de la vena femoral a razón de 4 ml/kg de una solución al 2% en NaCl 0.9%. Posteriormente, las ratas se sacrificaron por perfusión transcardial para lo que se les administró pentobarbital sódico vía intraperitoneal a razón de 2 ml/kg de una solución de 0.063 g/ml. Se verificó que los animales se encontraran completamente anestesiados mediante estímulos físicos, y se realizó una incisión a la altura de la apófisis xifoides, se cortó el músculo diafragma por debajo del esternón hasta descubrir al corazón levantando la caja torácica y se perforó la aurícula derecha, se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo adaptada a una manguera que mediante una bomba de perfusión permitió el lavado del sistema circulatorio de los animales con 250 ml de solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (para análisis de porcentaje de volumen de infarto) o 250 ml de NaCl 0.9% (para análisis de viabilidad neuronal) durante 15 minutos aproximadamente. Cuando se verificó que la perfusión fue completa (por la transparencia del líquido perfundido) se realizó una craneotomía y se removió el cerebro.

Análisis macroscópico de la disrupción de la BHE

Los cerebros se colocaron en una matriz para obtener rebanadas coronales donde se realizaron 7 cortes coronales de 2 mm de espesor, luego fueron colocados en un orden consecutivo de la región frontal a la occipital, y se tomaron fotografías con el fin de identificar las áreas de mayor alteración en la permeabilidad de la BHE a juzgar por la presencia de coloración azul en el tejido cerebral (**Feng 2012**).

Evaluación del volumen de infarto cerebral

Sobre los cortes anteriores se realizó la tinción de TTC con una solución al 2% en PBS 1X en incubación a 37°C por 30 minutos en obscuridad. Las secciones se acomodaron y fotografiaron de la misma manera utilizando una escala en milímetros con el fin de calibrar las áreas medidas con el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos) para delimitar el área de infarto. Se realizó la corrección por edema del hemisferio ipsilateral con el contralateral para obtener las áreas de infarto corregidas, y con el valor del espesor del corte se obtuvieron los volúmenes de infarto a partir de las áreas cuantificadas (**Feng 2012**). Las fórmulas que se emplearon fueron las siguientes:

$$AIC = [AHC - (AHI - AI)]$$

AIC: Área del infarto corregida
AHC: Área del Hemisferio Contralateral
AHI: Área del Hemisferio Ipsilateral
AI: Área del Infarto

$$VHC = \sum AHC (2 \text{ mm})$$

VHC: Volumen del Hemisferio Contralateral

$$VI = \sum ACI (2 \text{ mm})$$

VI: Volumen del infarto

$$\% VI = \frac{VI}{VC} (100)$$

Una vez fotografiado el tejido se almacenó en congelación con una solución de sacarosa al 30% en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M hasta el momento de realizar las determinaciones de extravasación de azul de Evans (**Ansari, Azari et al. 2011**).

Determinación cuantitativa de la permeabilidad de la BHE por espectrofotometría (azul de Evans)

De la serie de experimentos de porcentaje de volumen de infarto con TTC a los que se les inyectó azul de Evans, con ayuda de bisturí y pinzas de disección se extrajeron 3 muestras de tejido de aproximadamente 50 mg por cada una de las dos secciones con mayor área de infarto del cerebro de la siguiente manera: una de la zona de foco isquémico, otra de la zona de penumbra (ambas del hemisferio Ipsilateral) y una tercera del hemisferio contralateral que corresponde anatómicamente con las anteriores. Se pesaron en una balanza analítica y se colocaron en tubos de 1.5 ml, luego se homogenizaron con un sonicador con 10 veces el valor de su peso en volumen de buffer de fosfatos salino (PBS) 1X. Se extrajeron alícuotas de cada muestra de 10 μ L para la cuantificación de proteínas que se realizó posteriormente y se reservaron a 4°C. A las muestras originales, se les agregó el mismo volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 60% que se les añadió de PBS 1X para precipitar proteínas, y se agitaron en un vortex durante 2 minutos, luego se centrifugaron a 12000 X g durante 15 minutos a 4°C. Se realizó una curva estándar con azul de Evans a las siguientes concentraciones 100, 200, 500, 1000, 2000 y 5000 ng/mL por triplicado, se colocaron 100 μ l de cada punto de la curva y sobrenadante de cada muestra en una placa de 96 pozos negra de fondo traslucido, y se cuantificó la cantidad de azul de Evans infiltrado. Se leyó la cantidad de azul de Evans en el espectrofluorómetro con un lector de placas a una excitación de 620 nm y una emisión de 680 nm y se construyó una curva estándar de concentración (ng/ml) contra unidades relativas de fluorescencia. Para cuantificar las alícuotas de homogenizado de proteína se construyó una curva estándar con albúmina de suero bovino a las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 10.0 y 14.0 mg/ml. Se tomaron por duplicado 3 μ l de cada muestra a analizar (homogenizado de proteína y curva) y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry.

Se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro y con la curva estándar se obtuvieron los valores de proteína de las muestras en mg/ml.

Finalmente, se obtuvo el cociente de la cantidad de azul de Evans infiltrada por cantidad de proteína de la siguiente manera:

$$\text{Azul de Evans por proteína} \left(\frac{ng}{mg} \right) = \frac{\text{Cantidad de azul de Evans extravasado} \left(\frac{ng}{mL} \right)}{\text{Cantidad de proteína en la muestra} \left(\frac{mg}{mL} \right)}$$

Evaluación microscópica de la viabilidad neuronal, conteos neuronales

Los cerebros perfundidos con NaCl 0.9% se extrajeron y colocaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente, se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% para su crioprotección. Luego, se realizaron cortes de 40 μm en el criostato a -22°C que se montaron en portaobjetos gelatinizados para garantizar máxima adherencia.

Se realizó la tinción con violeta de cresilo mediante fases de hidratación y deshidratación graduales en agua, concentraciones de alcohol etílico al 70%, 95%, 100% y xileno (**Rousselet, Kriz et al. 2012**). Se realizaron preparaciones permanentes con resina Permout (Fisher Scientific, New Jersey EUA), y se tomaron fotografías en el microscopio óptico de tres cortes adyacentes por cada experimento en diferentes zonas de la siguiente manera (Figura 17.):

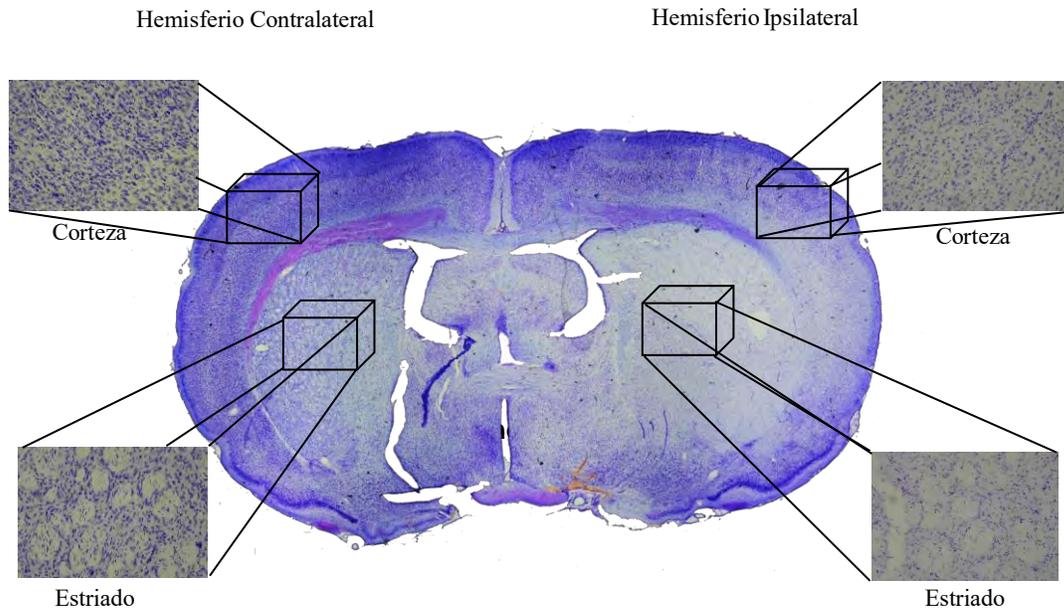


Fig. 17. Zonas de obtención de las microfotografías para el análisis de los conteos

Las fotografías se procesaron mediante el software ImageJ donde se determinó el número de neuronas viables por área (Figura 18.):

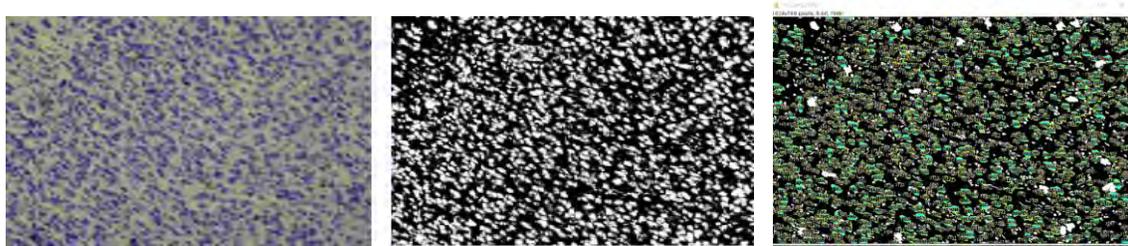


Fig. 18. Procesamiento de fotografías digitales con ImageJ para conteo neuronal

Con las medidas en pixeles obtenidas de una fotografía de calibración se convierten las unidades en pixeles en unidades por milímetros y finalmente se calcula cantidad de neuronas por área en mm^2 y mm^3 (Figura 19.):

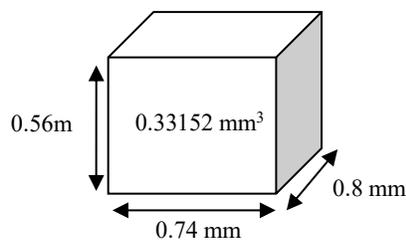


Fig. 19. Transformación de área a volumen para cuantificación de la densidad neuronal

Evaluación cualitativa de la fuga de proteínas en la BHE por fluorescencia

Tras la administración del azul de Evans se obtuvieron cortes coronales de 40 μm y se montaron en laminillas para posteriormente ser observadas en el microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de excitación de 620 nm y emisión de 680 nm. El tejido cerebral presenta una leve fluorescencia basal en esa longitud de onda, por lo que solo se analizaron las zonas con fluorescencia mayor a esta.

Inmunohistofluorescencia

Para esta serie de experimentos no se administró azul de Evans. Se sacrificaron y perfundieron a los animales con 250 ml NaCl 0.9% durante 15 minutos y se extrajeron los cerebros. Se realizaron 4 cortes coronales gruesos por cada cerebro (A, B, C y D) y se colocaron los cortes B y C en frascos con 10 ml de 2-metilbutano a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se pasaron a otros frascos con 2-metilbutano a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Pasado este tiempo se guardaron individualmente ambos cortes en papel aluminio y se reservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta por un periodo aproximado de 3 meses. Se tomó uno de los dos cortes que abarcaba el área del estriado y corteza, y se realizaron cortes de 14 μm en el criostato. Se montaron 3 cortes en un portaobjetos y se dejaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, posteriormente se sumergieron en alcohol metílico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, se enjuagaron con PBS 1X por 5 minutos, se permeabilizó el tejido con Tritón X100 al 0.2% en PBS 1X y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Posteriormente, se realizó el bloqueo con BSA 5% y Tritón X100 en PB 0.1 M a temperatura ambiente en una cámara de humedad por 2 horas, y se lavó. Se aplicaron anticuerpos primarios PECAM-1 (hecho en ratón) 1:100 y claudina-5 1:100 (hecho en conejo) en solución de bloqueo por 48 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cuarto frío) y en cámara de humedad, se realizaron lavados y se aplicaron los anticuerpos secundarios PECAM-1 Alexa Flour 488 goat α -mouse 1:200 y claudina-5 Alexa Flour 546 goat α -rabbit 1:200 a temperatura ambiente en oscuridad y en cámara de humedad. Se realizaron 3 lavados y se

aplicó Hoechst 33342 durante 10 minutos en oscuridad para marcar los núcleos, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno y se aplicó Dako Mounting Medium (Glostrup, Dinamarca) para colocar los cubreobjetos de fluorescencia.

VOLUMEN DE INFARTO				
Tratamiento	Vehículo	VEGF 50 ng	VEGF 100 ng	SU-1498
>60% - <90%	5	5	3	5
>90%	2	1	2	0

% Caída de perfusión cerebral

Se dejaron secar por 24 horas, se sellaron con barniz y se analizaron por microscopía confocal. En cada laminilla se localizó la zona de infarto, se utilizó un aumento de 63X (inmersión en aceite) y se realizaron fotografías multicanal en reconstrucción en Z para conseguir un grupo de imágenes de macro y microvasculatura cerebral (**Bauer, Burgers et al. 2010**).

Grupos de estudio

VIABILIDAD NEURONAL				
Tratamiento	Vehículo	VEGF 50 ng	VEGF 100 ng	SU-1498
Corteza	5	5	3	5
Estriado	2	1	2	0

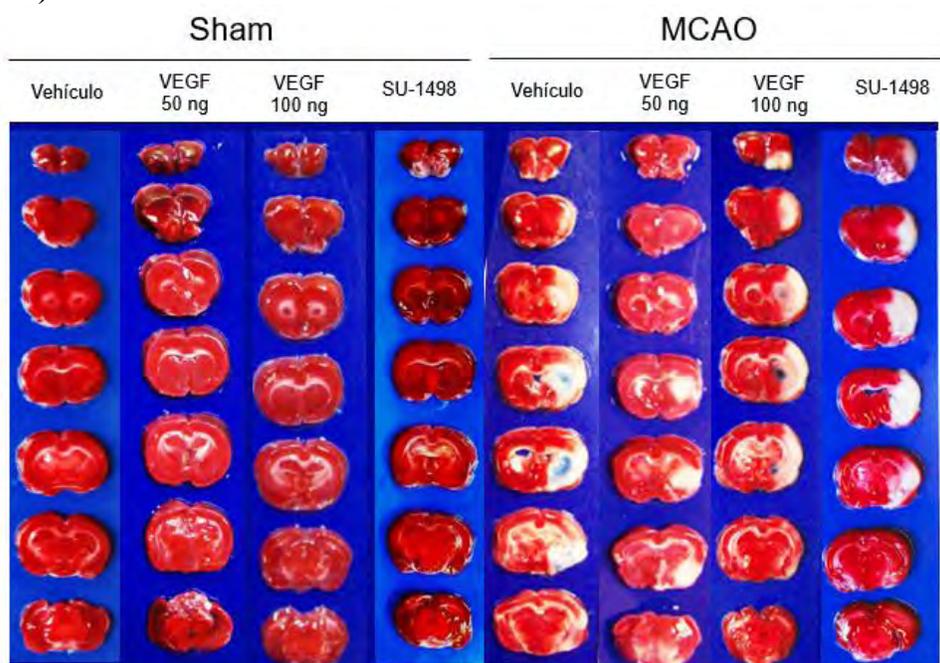
EVALUACIÓN DE LA BHE				
Tratamiento	Vehículo	VEGF 50 ng	VEGF 100 ng	SU-1498
Foco	6	9	7	7
Penumbra	6	9	7	7

RESULTADOS

Volumen de infarto

Con la finalidad de obtener el volumen de infarto, mediante la técnica de tinción con TTC, en los resultados de evaluación del volumen de infarto (Figura 20 A) se encontró un mayor efecto neuroprotector con la dosis administrada de manera exógena de 50 ng (13.472 +/- 12.231 %) que con el de vehículo (30.132 +/- 13.231 %) y con el doble de VEGF (100ng) (28.260 +/- 20.593 %) (Figura 20 B). Esta serie de experimentos se realizaron sobre ratas a las que se les produjo una oclusión de 60 al 90% del flujo sanguíneo cerebral determinado mediante flujometría laser doppler (LDF), pues con infartos ocasionados por oclusiones mayores al 90% no se observa neuroprotección significativa mediada por el VEGF exógeno. (Vehículo 35.045 +/- 9.567 %, VEGF 50 ng 35.71 +/- 0.0 %, VEGF 100 ng 36.053 +/- 13.789 %, ningún experimento para SU-1498) (Figura 20 C).

A)



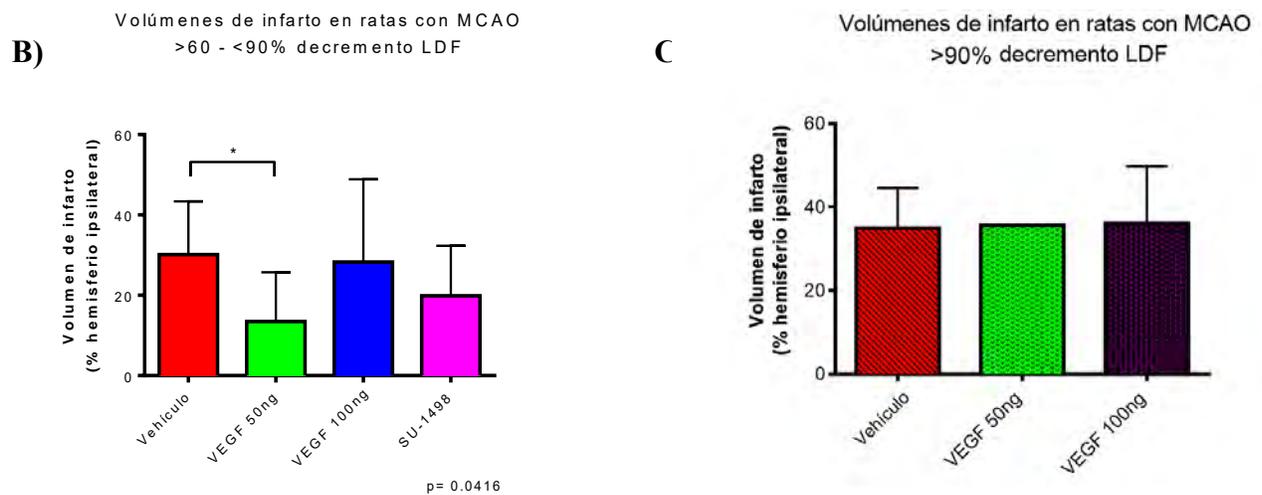


Fig. 20. Resultados de la cuantificación del volumen de infarto en los diferentes grupos. A) Fotografías representativas de los diferentes grupos donde se aprecian las diferentes magnitudes de infarto entre los diversos grupos. B) Volúmenes de infarto con caídas en la perfusión mayor a 60% y menor a 90%. Vehículo n=5, VEGF 50 ng n=5, VEGF 100 ng n=3, SU-1498 n=5, se obtuvo significancia entre los grupos con $p < 0.0416$. C) Volúmenes de infarto con caída en la perfusión mayor a 90%. Vehículo n=2, VEGF 50 ng n=1, VEGF 100 ng n=2, SU-1498 n=0, no hubo significancia entre los valores.

Por otra parte, se demostró que el inhibir al VEGFR2 con SU-1498 la zona de infarto cerebral (19.886 ± 12.452 %) presenta una proporción similar al grupo de vehículo.

Viabilidad neuronal

Con el fin de corroborar estos volúmenes de infarto a nivel microscópico se empleó la tinción de violeta de cresilo. Con estas preparaciones se observó la presencia de los cuerpos de Nissl (Figura 21) así como se logró tener entendimiento más fino de lo que le ocurre a las células en la zona de isquemia y penumbra (Figura 22) además de observarse el fenómeno de los núcleos picnóticos al observarse una neurona cortical en un área sana (Figura 23 A) y otra en el área afectada por el infarto (Figura 23 B).

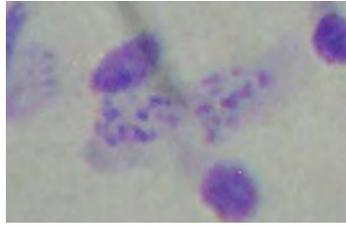


Fig. 21 Cuerpos de Nissl

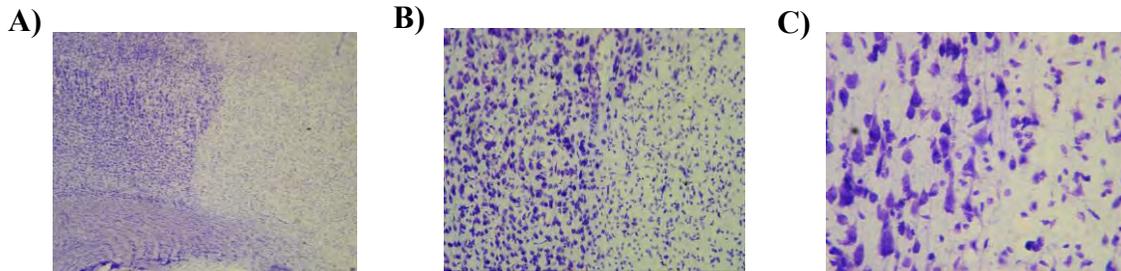


Fig. 22 Transición de la zona de tejido sano a penumbra y foco isquémico A) 10X B) 20X y C) 40X.

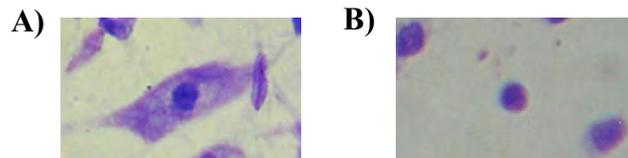


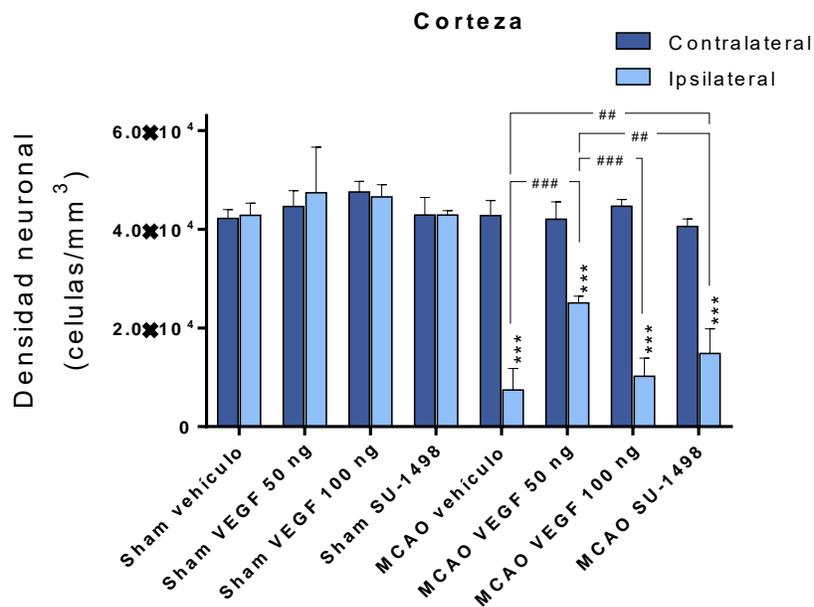
Fig. 23 A) Neurona sana (citoplasma y núcleo bien definido). B) Neurona isquémica (desaparición del citoplasma y núcleo picnótico)

En el tejido contralateral de corteza se encontró un número de neuronas por mm^3 en promedio de $43,396.492 \pm 2,138.119$ y en estriado de $54,735.636 \pm 2,540.053$. En tejido ipsilateral de corteza ($n=5$) se encontró la mayor muerte neuronal con el grupo de vehículo ($7,404.279 \pm 4,385.01$ células / mm^3), en tanto que con el tratamiento de 50 ng de VEGF ($n=3$) se obtuvo el mayor efecto neuroprotector sobre las neuronas al evitar que murieran más del 50% de estas ($25,042.900 \pm 1,393.558$). Al administrar 100 ng de VEGF ($n=3$) ($10,195.460 \pm 3,710.606$) y con SU-1498 ($n=3$) ($14,840.730 \pm 4,996.325$) las proporciones de muerte neuronal resultaron similares al grupo de vehículo, observándose una ligera neuroprotección al inhibir la acción del VEGF (Figura 24 A). En el tejido estriado, las proporciones resultaron muy similares al tejido de corteza, en el grupo de vehículo ($n=5$) se presentó un enorme número de muerte neuronal con muy pocas sobrevivientes

(9,511.744 +/- 2373.420); se obtuvo mayor rescate neuronal con el tratamiento de 50 ng (n=3) (29,218.950 +/- 9,299.938) que con el de 100 ng (n=3) (8,157.711 +/- 3,190.515). Con el de inhibidor (n=3) también se observó mayor número de neuronas rescatadas (22274.510 +/- 5170.748) en comparación al vehículo (Figura 24 B).

Los resultados obtenidos con este método confirmaron los obtenidos por la tinción de TTC, con 50 ng de VEGF se protege mejor a las neuronas provocando que mueran menos, en comparación con 100 ng y evidentemente con el grupo de vehículo.

A)



B)

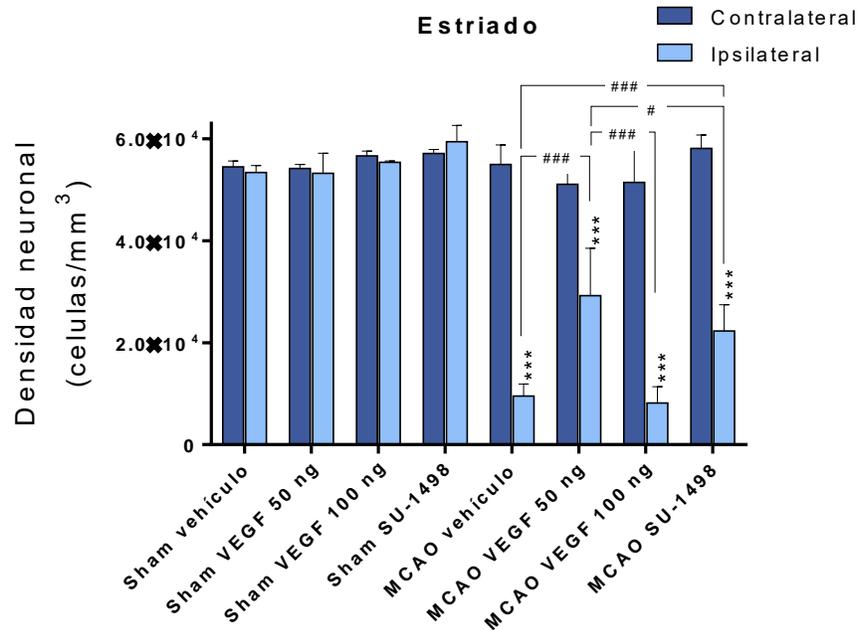


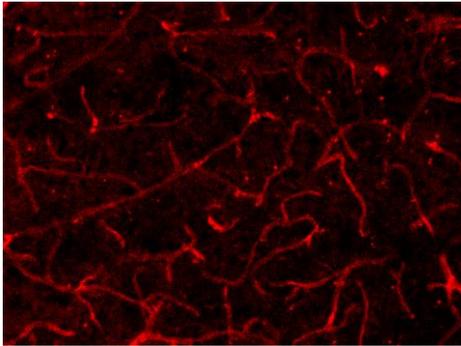
Fig. 24. Cuantificación neuronal. A) Estimación de la densidad neuronal en neuronas de la corteza entre los diferentes grupos. Vehículo n=5, VEGF 50 ng n=3, VEGF 100 ng n=3, SU-1498 n=3. B) Estimación de la densidad neuronal en neuronas del estriado entre los diferentes grupos. Vehículo n=5, VEGF 50 ng n=3, VEGF 100 ng n=3, SU-1498 n=3, # = p< 0.05, ## = p< 0.01, ### = p< 0.001.

Permeabilidad de la BHE

Al demostrar con el volumen de infarto y viabilidad neuronal el efecto neuroprotector de los 50 ng de VEGF, se analizó que ocurría a nivel de la BHE y sus alteraciones.

Se encontró que las zonas más afectadas tanto por la isquemia como por la infiltración del azul de Evans son el estriado y la corteza, y estas fueron las zonas que se estudiaron para las determinaciones de la infiltración del colorante. En los cerebros a los que no se les indujo infarto no se presentó extravasación del marcador de permeabilidad de la BHE. Esto se comprobó al obtener fotografías de epifluorescencia de un cerebro intencionalmente no perfundido, que conservaba el colorante en su vasculatura (Figura 25.).

A)



B)

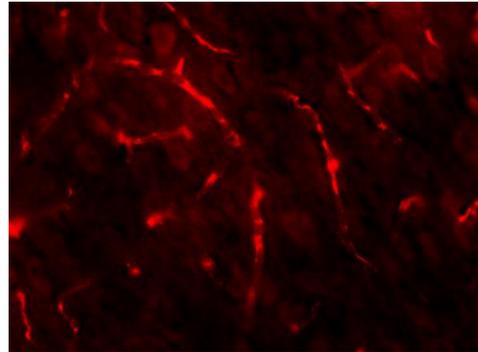


Fig. 25. Fotografías de epifluorescencia. A) Micovascularura cerebral no perfundida donde se aprecia el azul de Evans en el lumen vascular. B) Algunos hematíes confirman la localización.

En los cerebros sometidos a MCAO, la BHE se altera y pierde su capacidad de retener efectivamente a la albúmina, lo que provoca que ésta logre cruzar de la vasculatura al parénquima, como se observa en la fotografía de MCAO Vehículo. (Figura 26.)

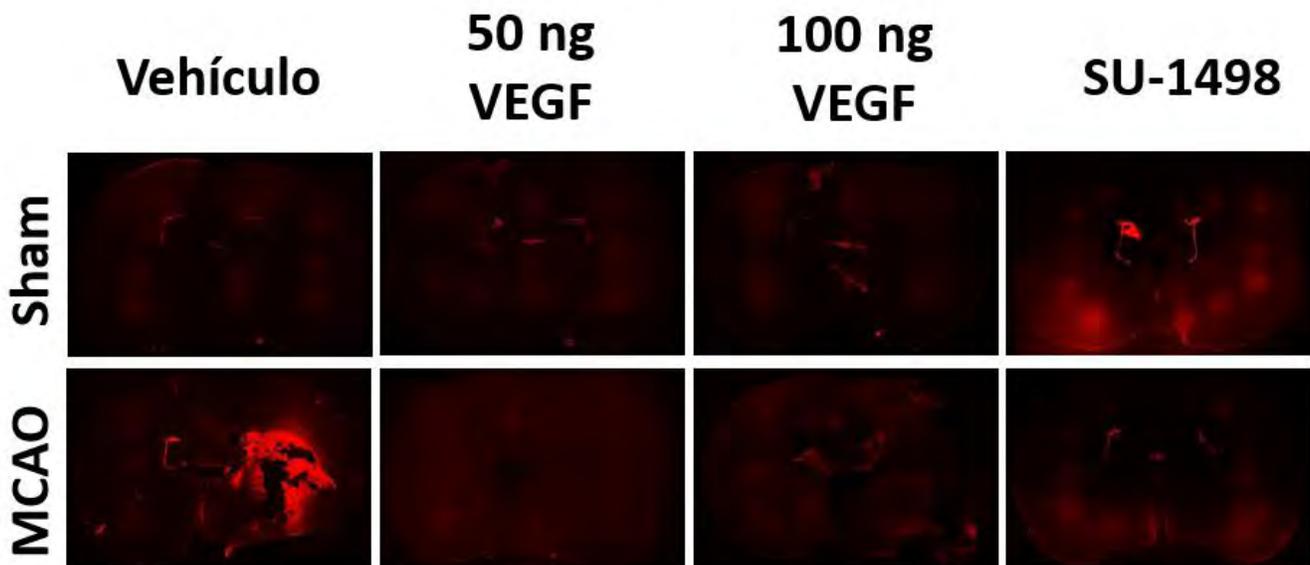
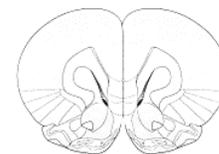


Fig. 26. Fluorescencia in situ del azul de Evans en tejido cerebral en las diferentes condiciones.

El infarto por sí mismo causa alteración de la BHE por los mecanismos previamente descritos, pero la infiltración del azul de Evans no se puede detectar siempre por fotografías de fluorescencia, además de ser necesario un método cuantitativo de la infiltración del marcador. Los resultados obtenidos de esta determinación cuantitativa indicaron en el área del foco isquémico en promedio de las dos regiones (I y II), una extravasación de 152.941 ng/mg en el grupo de vehículo, disminuida en el grupo de 50 ng de VEGF a 17.332 ng/mg pero de 100.222 ng/mg en el grupo de VEGF 100 ng lo que indica que la barrera sufre más alteraciones conforme aumenta la cantidad de VEGF administrado.

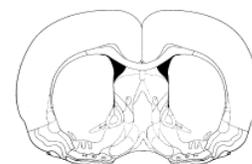
Con la administración del inhibidor se observó una baja permeabilidad de la barrera al azul de Evans presumiblemente al evitar que VEGF actúe sobre su receptor (19.975 ng/mg) (Figura 27 A). En la zona de penumbra isquémica, en promedio, la extravasación fue menor incluso para el grupo al que se le administró vehículo (89.161 ng/mg). Con VEGF 50 ng (34.480 ng/mg) y VEGF 100 ng (11.1335 ng/mg), se observó nuevamente diferencia significativa, con SU-1498 se disminuyó casi por completo la permeabilidad al azul de Evans (1.778 ng/mg). (Figura 27 B). Debido a la elevada variabilidad entre los experimentos, no es conveniente trabajar con desviaciones estándar, por lo que se trataron los experimentos graficando individualmente los resultados. Los niveles más altos de extravasación se obtuvieron en la zona de foco, ya que es donde las alteraciones se presentan con mayor intensidad, a diferencia de la penumbra isquémica, ya que la integridad de la BHE se encuentra menos comprometida.

A)



Región I

B)



Región II

Fig. 27. Cuantificación de la infiltración del azul de Evans en el tejido cerebral. A) Foco isquémico y B) Penumbra (Vehículo n=6, VEGF 50 ng n=9, VEGF 100 ng n=7, SU-1498 n=7).

Cambios estructurales y funcionales de la BHE

Con el fin de estudiar alteraciones estructurales en la BHE se analizó el efecto de la isquemia y de los diferentes tratamientos sobre el patrón de expresión de uniones estrechas identificadas con el marcaje de claudina-5 y PECAM-1.

La mayor parte de las alteraciones de las células endoteliales que conforman la vasculatura cerebral durante de la isquemia ocurre en la microvasculatura (Figura 27 A), por lo que el trabajo se enfocó al estudio de ésta y no de la macrovasculatura cerebral (Figura 28 A). La continuidad de la presencia de claudina-5 sugiere microvasculatura sana y estable, para confirmar que se trataba de esta proteína se realizó un co-marcaje con PECAM-1, una proteína constitutiva de las células. Para el marcaje de los núcleos de las células se empleó Hoechst 33342. Cuando la claudina-5 presenta alteraciones en su expresión la marca se pierde y se observa una discontinuidad en el patrón. Para este fin, el análisis de la presencia de brechas se realizó solo con la marca de claudina-5 y de los núcleos.

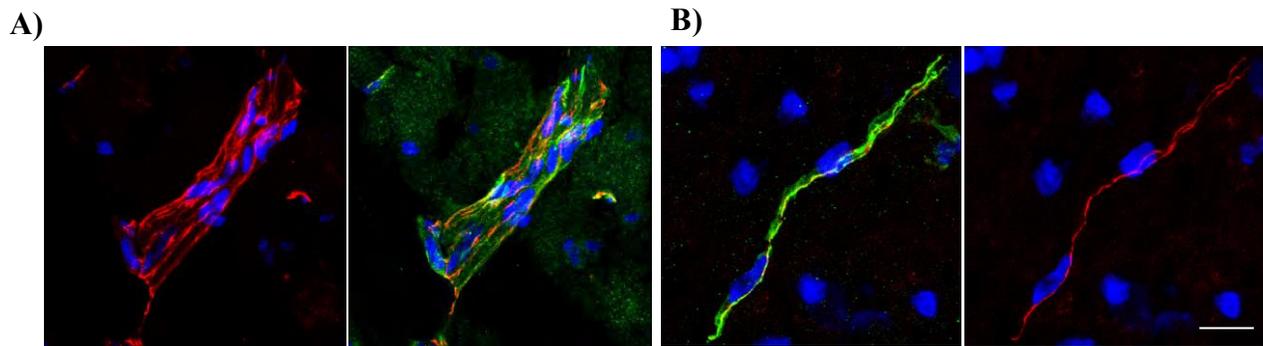


Fig. 28. Fotografías de microscopia confocal de inmunofluorescencias cerebral en condiciones control (Sham) y con infarto (MCAO) con los diferentes tratamientos. Núcleos (Azul), cldn-5 (Rojo), PECAM-1 (Verde). Scale bar: 20 μ m. A) Macrovasculatura. B) Microvasculatura

Se encontró que incluso en los cerebros sham, la marca de claudina-5 con diferentes dosis de VEGF presenta brechas. Con la dosis de 50 ng se presentan pocas alteraciones, pero con 100 ng de VEGF las alteraciones aumentan en forma y número, observándose grandes brechas que separan la continuidad de vaso, este efecto destructivo en la BHE se revirtió al emplear el inhibidor de VEGFR2, donde no se observaron alteraciones en la continuidad de claudina-5.

En el grupo con MCAO se encontró que el infarto por sí mismo induce alteraciones en la BHE, concretamente en la integridad de las uniones estrechas, perdiéndose casi por completo la marca de PECAM-1 y de claudina-5 con sus respectivas brechas prominentes a lo largo de toda la microvasculatura cerebral (Figura 29).

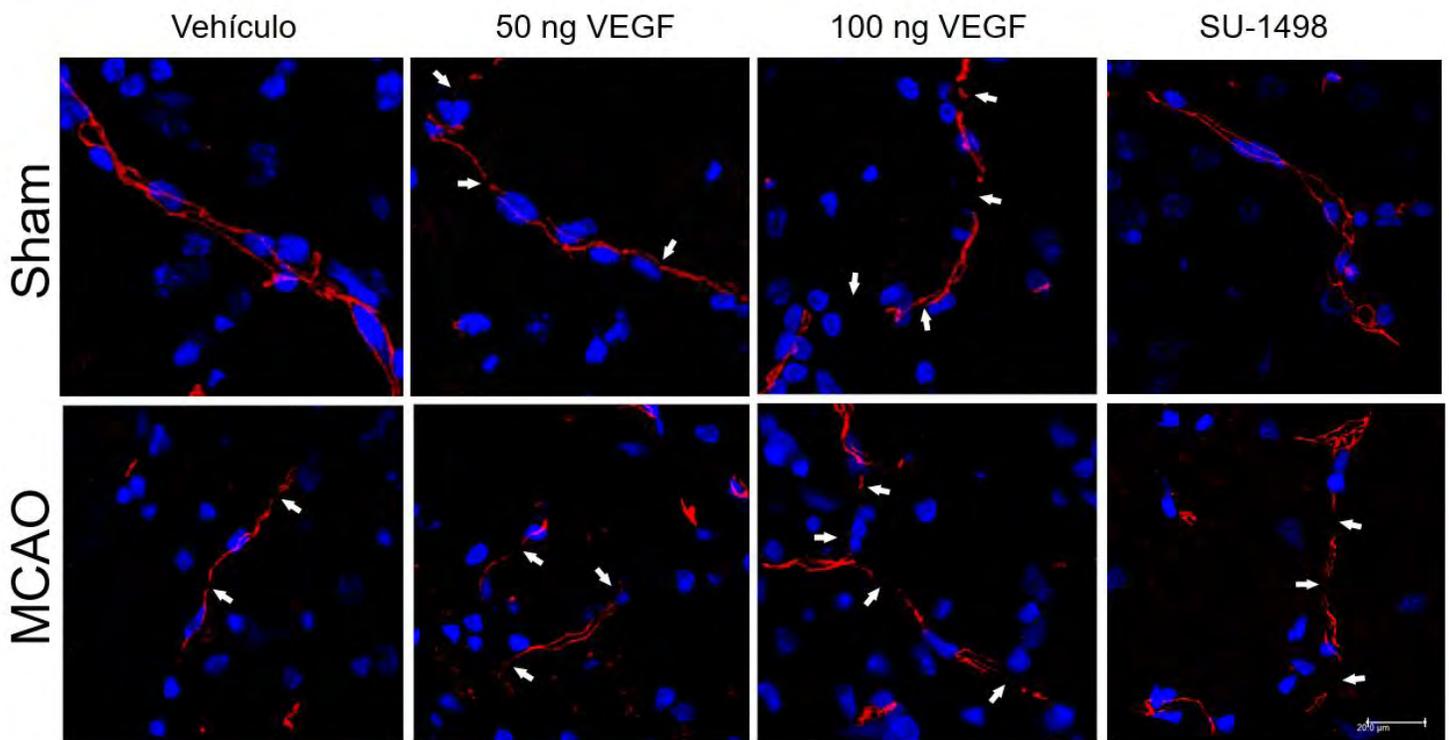


Fig. 29. Fotografías de microscopia confocal de inmunofluorescencias de microvasculatura cerebral en condiciones control (sham) y con infarto (MCAO) con los diferentes tratamientos. Las flechas blancas señalan la presencia de brechas o interrupciones en los vasos Núcleos (Azul), cldn-5 (Rojo), PECAM-1 (Verde). Scale bar: 20 μm.

ANALISIS DE RESULTADOS

En condiciones fisiológicas el VEGF se expresa de manera basal en el cerebro, pero la isquemia induce una fuerte sobreexpresión principalmente por la vía de HIF, el incremento de VEGF en la zona circundante al foco isquémico ocurre de 6 a 24 horas luego de instaurada la isquemia no solo en la zona circundante al infarto, sino en regiones corticales remotas. Se ha demostrado que el VEGF endógeno provee neuroprotección al tejido hipóxico, pero que no es suficiente para evitar los efectos severos de muerte neuronal en el infarto cerebral, por lo que se buscó potenciar este efecto administrando VEGF recombinante de manera exógena **(Wang, Kilic et al. 2005)**. La sobreexpresión de VEGF en la isquemia es un fenómeno ampliamente estudiado y reportado, así como la inducción del edema vasogénico mediado por éste. También está reportado el papel que juegan tanto el VEGF como su inhibición en la neuroprotección, por un lado, el VEGF favorece la neovascularización y activa vías de supervivencia que favorecen la neuroprotección, por lo que la inhibición de su acción aumentaría el daño por la isquemia. Por otro lado, la sobreactivación de sus receptores exacerba el edema cerebral en la fase más crónica de la reperfusión aumentando también el daño inicial de la isquemia. La unión a sus diversos receptores, y la activación de diversas vías hacen del mecanismo de acción del VEGF un fenómeno complejo **(Ma, Zechariah et al. 2012)**.

Nuestros datos indican que ambas cantidades administradas de VEGF así como la inhibición de éste; ofrecen cierto grado de neuroprotección comparado con la liberación endógena de éste, lo que nos da la idea de que el mecanismo por el cual el VEGF promueve su acción se encuentra muy relacionado con la cantidad administrada, la dosis de 50 ng de VEGF reduce significativamente la infiltración del colorante azul de Evans en el parénquima cerebral, pero no la abole por completo, lo cual puede ser indicativo de que esta apertura de la BHE con su respectivo aumento en la permeabilidad podrían estar íntimamente ligados a los mecanismos

de neuroprotección (Figura 30). Este hallazgo es muy importante, dado que la apertura de la BHE podría no ser del todo lesiva, e inclusive cierto grado de neuroinflamación puede resultar beneficioso al contrarrestar la cascada de daños que la isquemia origina (**Boguslawski, McGlynn et al. 2004**).

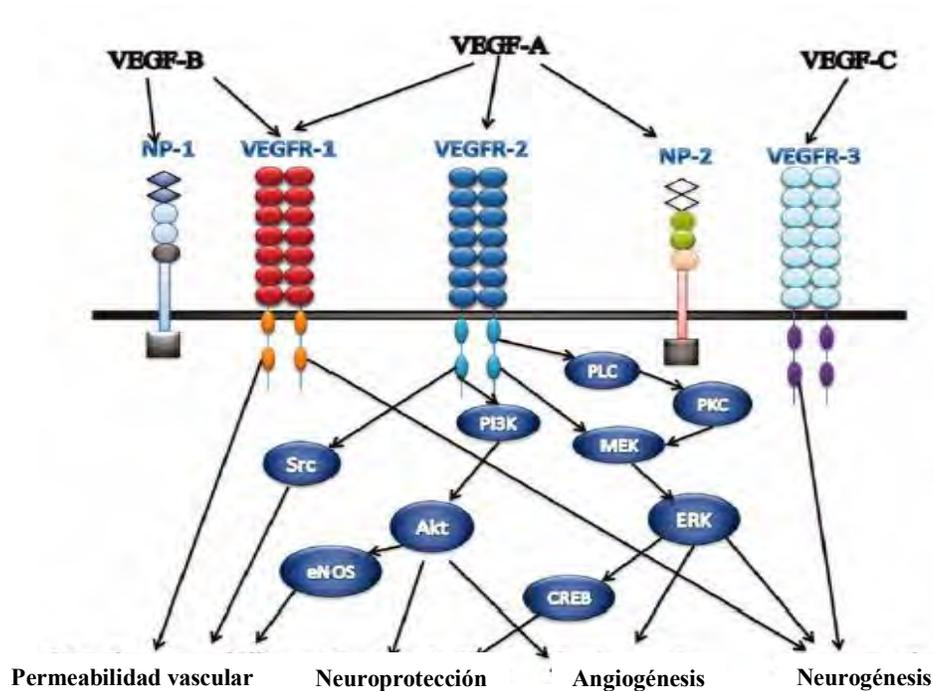


Fig. 30. Cascada de señalización y efectos desencadenados río abajo (downstream) tras la unión del VEGF-A al VEGFR2. (Tomado de (Ma, Zechariah et al. 2012))

Gran parte de los efectos del VEGF en la isquemia cerebral tienen que ver con la vía y el tiempo de administración, cuando se administra por vía directa en el parénquima cerebral (como ocurre con la vía i.c.v.) los efectos observados son benignos, y prevalece la neuroprotección, sin embargo cuando se administra por vía sistémica (i.a., i.v., i.p.) se incrementa el daño por el infarto, la inflamación, el daño a la microvasculatura y la tendencia a que el infarto isquémico evolucione a hemorrágico. La única evidencia de que el VEGF puede ser benéfico por vía sistémica es que debe ser administrado en el periodo post-agudo de 2 a 3 días tras

la isquemia, sin embargo, la administración un día antes, inmediatamente después, o 1 hora después de la isquemia también son desfavorables. **(Ma, Zechariah et al. 2012).**

Los resultados obtenidos del volumen de infarto y de la viabilidad neuronal sugieren que el VEGF endógeno liberado no es suficiente para inducir una respuesta neuroprotectora en el organismo, en tanto que la dosis de 50 ng sí lo es.

Este efecto ha sido ampliamente reportado, se sabe que el VEGF induce neuroprotección por los mecanismos propuestos con anterioridad, en tanto que, era de esperarse que este efecto resultase dosis-dependiente, sin embargo con nuestros resultados de la serie de experimentos de 100 ng de VEGF no obtuvimos esta relación.

En el grupo del inhibidor se observó la alteración de la BHE por debajo del grupo de vehículo y de las dosis de VEGF. En nuestros resultados de permeabilidad al azul de Evans encontramos que a mayor dosis de VEGF se presenta mayor extravasación del marcador, incluso con 50 ng de VEGF se obtiene mayor permeabilidad comparado con los grupos sham, aunque estos no resultaron lo suficientemente elevados para ser detectados cuantitativamente por el método empleado. Este aumento en la permeabilidad de la BHE con la dosis alta de VEGF, comparada con la de 50 ng sugiere una sobre activación de los mecanismos de degradación de las uniones estrechas mediante la MMP-9 mediada por las células periféricas infiltradas a la zona de daño. Existe fuerte evidencia de que el VEGF disminuye la integridad de claudina 5 (Figura 31). **(Argaw, Gurfein et al. 2009)**

El que una proteína como el caso de la albúmina, o cualquier otra molécula logre atravesar la BHE no se debe exclusivamente a alteraciones en las uniones estrechas que la conforman, sino a otro mecanismo de transporte celular conocido como transcitosis **(Knowland, Arac et al. 2014)**

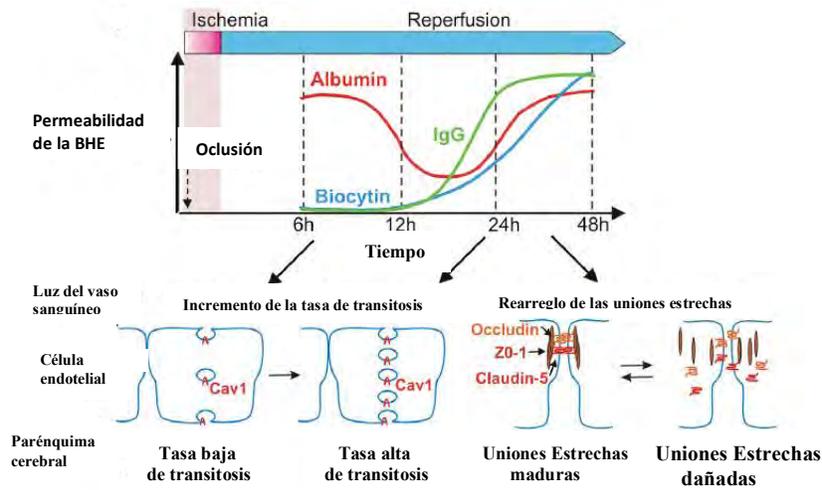


Fig. 31. Mecanismos de transporte trans y paracelular incrementados en el periodo de reperfusion. Tomado de (Knowland, Arac et al. 2014)

En los resultados de cuantificación de la infiltración del azul de Evans en muestras de foco isquémico se observó un valor positivo incluso con la comprobación de que en el grupo de SU-1498, inhibiendo a VEGF no se afecta a las uniones estrechas, lo que hace suponer que el mecanismo por el cual la albúmina penetra al parénquima, sea a través de la transcitosis (Willis, Leach et al. 2004). Este mecanismo involucra procesos de endocitosis y exocitosis dentro de la célula que integra a la albúmina a sus membranas hasta que esta logra atravesar toda la célula. Durante el periodo de reperfusion existe una apertura bifásica de la BBE, que permite la entrada de sustancias al parénquima cerebral mediante caveolas internas asociadas a bajas tasas de transcitosis que aumentan en número y actividad una vez instaurada la isquemia, este mecanismo independiente del transporte paracelular permite también un aumento en la permeabilidad de la BBE (Knowland, Arac et al. 2014).

CONCLUSIONES

- La dosis de 50 ng de VEGF administrado i.c.v. tiene el mejor efecto neuroprotector, con la mayor disminución del volumen de infarto y menor muerte neuronal, en tanto que las condiciones donde se aumenta la dosis o se evalúa sólo el VEGF endógeno no son favorables para la recuperación postisquémica.
- La dosis de 100 ng de VEGF administrada de manera exógena induce cambios significativos en la permeabilidad de la BHE, aumentando la cantidad del marcador de azul de Evans en el parénquima cerebral. Este efecto es disminuido con la dosis baja de 50 ng de VEGF, pero no es abolido por completo con el inhibidor del VEGFR2.
- El infarto isquémico induce la generación de alteraciones conformacionales de la proteína claudina-5 en la zona de penumbra, este efecto es exacerbado proporcionalmente por la cantidad administrada de VEGF exógeno. Al inhibir al VEGR2 este efecto se revierte.

PERSPECTIVAS

La administración i.c.v. del VEGF conlleva una importante serie de problemas técnicos y de salud, y dado que el VEGF administrado por vía IV no logra ejercer su acción sobre las neuronas isquémicas en el parénquima, se han buscado formas de administrar éste con una técnica no invasiva. Dentro del organismo la liberación del VEGF se lleva a cabo mediante microvesículas celulares llamadas exosomas. Se contempla el uso de estos cuerpos vesiculares como vehículos endógenos que logren atravesar la BHE para entregar algún péptido o fármaco de interés como el VEGF recombinante.

Por otra parte de acuerdo a nuestros resultados, el administrar una dosis baja de VEGF (50 ng) disminuye la permeabilidad de la BHE comparado con el grupo vehículo, por lo que pensamos que el mecanismo por el cual se da esta permeabilidad excesiva no sea el de transporte paracelular, sino por el de transcitosis, un inhibidor de caveolina ayudará a comprender el mecanismo por el cual esto ocurre.

REFERENCIAS

- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Agani, F. and B. H. Jiang (2013). "Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer." Curr Cancer Drug Targets **13**(3): 245-251.
- Albers, G. W., L. R. Caplan, et al. (2002). "Transient ischemic attack--proposal for a new definition." N Engl J Med **347**(21): 1713-1716.
- Ansari, S., H. Azari, et al. (2011). "Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice." J Vis Exp(51).
- Arango-Davila, C., M. Escobar-Betancourt, et al. (2004). "[Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice]." Rev Neurol **39**(2): 156-165.
- Argaw, A. T., B. T. Gurfein, et al. (2009). "VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1977-1982.
- Bai, Y., X. Zhu, et al. (2015). "Pericytes contribute to the disruption of the cerebral endothelial barrier via increasing VEGF expression: implications for stroke." PLoS One **10**(4): e0124362.
- Bauer, A. T., H. F. Burgers, et al. (2010). "Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement." J Cereb Blood Flow Metab **30**(4): 837-848.
- Bederson, J. B., L. H. Pitts, et al. (1986). "Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats." Stroke **17**(6): 1304-1308.
- Beilharz, E. J., C. E. Williams, et al. (1995). "Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss." Brain Res Mol Brain Res **29**(1): 1-14.
- Bejot, Y., A. Catteau, et al. (2008). "Trends in incidence, risk factors, and survival in symptomatic lacunar stroke in Dijon, France, from 1989 to 2006: a population-based study." Stroke **39**(7): 1945-1951.
- Belanger, M., I. Allaman, et al. (2011). "Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation." Cell Metab **14**(6): 724-738.
- Belayev, L., R. Busto, et al. (1996). "Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats." Brain Res **739**(1-2): 88-96.
- Blumenfeld, H. (2010). Neuroanatomy Through Clinical Cases, Sinauer Associates, Incorporated.
- Boguslawski, G., P. W. McGlynn, et al. (2004). "SU1498, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2, causes accumulation of phosphorylated ERK kinases and inhibits their activity in vivo and in vitro." J Biol Chem **279**(7): 5716-5724.

- Canazza, A., L. Minati, et al. (2014). "Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies." Front Neurol **5**: 19.
- Cao, G., Y. Luo, et al. (2002). "Cloning and characterization of rat caspase-9: implications for a role in mediating caspase-3 activation and hippocampal cell death after transient cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **22**(5): 534-546.
- Castillo, J. and I. Rodriguez (2004). "Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice." Cerebrovasc Dis **17 Suppl 1**: 7-18.
- Chen, H., Y. Qu, et al. (2012). "Role of mammalian target of rapamycin in hypoxic or ischemic brain injury: potential neuroprotection and limitations." Rev Neurosci **23**(3): 279-287.
- Chen, H., T. Xiong, et al. (2012). "mTOR activates hypoxia-inducible factor-1alpha and inhibits neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia." Neurosci Lett **507**(2): 118-123.
- Chin, D. and A. R. Means (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." Trends Cell Biol **10**(8): 322-328.
- Chiquete E, R.-S. J., Murillo-Bonilla LM, et al. (2012). "Egresos por enfermedad vascular aguda en instituciones públicas del sector salud de México: Un análisis de 5.3 millones de hospitalizaciones en 2010." Rev Mex Neuroci (**5**): 252-258.
- Diane, L. T., Elaine L. Gong, Christiaan Leeuwenburgh, Jay W. Heinecke, Elaine L. Carlson, Judy G. Verstuyft, Charles J. Epstein (1997). "Fatty streak formation in fat-fed mice expressing human copper-zinc superoxide dismutase." American Heart Association **17**: 1734-1740.
- Dieterle, A. M., P. Bohler, et al. (2014). "PDK1 controls upstream PI3K expression and PIP3 generation." Oncogene **33**(23): 3043-3053.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.
- Durukan, A. and T. Tatlisumak (2007). "Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia." Pharmacol Biochem Behav **87**(1): 179-197.
- E. Díez-Tejedor, O. D. B., J. Álvarez-Sabín, M. Muñoz, G. Abiusi (2001). "Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares." REV NEUROL **33**(5): 455-464.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Escarbajal, D. A. L., G.J. ; Portavella, M. ; Carrasco, V.M. ; et al. (2006). Fundamentos de psicobiología, libro de prácticas I.
- Feigin, V. L., M. H. Forouzanfar, et al. (2014). "Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet **383**(9913): 245-254.
- Feigin, V. L., C. M. Lawes, et al. (2009). "Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review." Lancet Neurol **8**(4): 355-369.
- Feng, Z. J., C. (2012). Infarct Measurement in Focal Cerebral Ischemia: TTC Staining.

- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.
- Goncalves, A., A. F. Ambrosio, et al. (2013). "Regulation of claudins in blood-tissue barriers under physiological and pathological states." Tissue Barriers **1**(3): e24782.
- Grothey, A. and E. Galanis (2009). "Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules." Nat Rev Clin Oncol **6**(9): 507-518.
- Hallenbeck, J., G. Del Zoppo, et al. (2006). "Immunomodulation strategies for preventing vascular disease of the brain and heart: workshop summary." Stroke **37**(12): 3035-3042.
- Herrera, M.-E. y. (2006). "Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer." Cancerología **1**: 83-96.
- Herrera, M.-E. y. (2006). "Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer." Cancerología **1**: 83-96.
- Hossmann, K. A. (1994). "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia." Ann Neurol **36**(4): 557-565.
- Huang, J., C. C. Dibble, et al. (2008). "The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2." Mol Cell Biol **28**(12): 4104-4115.
- Hudson, N., M. B. Powner, et al. (2014). "Differential apicobasal VEGF signaling at vascular blood-neural barriers." Dev Cell **30**(5): 541-552.
- Isayama, K., L. H. Pitts, et al. (1991). "Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts." Stroke **22**(11): 1394-1398.
- Jiang, S., R. Xia, et al. (2014). "Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier." PLoS One **9**(2): e86407.
- Kliche, S. and J. Waltenberger (2001). "VEGF receptor signaling and endothelial function." IUBMB Life **52**(1-2): 61-66.
- Knowland, D., A. Arac, et al. (2014). "Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke." Neuron **82**(3): 603-617.
- Koizumi J, Y. Y., Nakazawa T, Ooneda G (1986). "Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area." JPN J Stroke **8**: 1-8.
- Kolominsky-Rabas, P. L., M. Weber, et al. (2001). "Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study." Stroke **32**(12): 2735-2740.
- Koyama, J., S. Miyake, et al. (2010). "The novel VEGF receptor antagonist, VEGA1155, reduces edema, decreases infarct and improves neurological function after stroke in rats." Kobe J Med Sci **56**(1): E1-11.
- Krause, G., J. Protze, et al. (2015). "Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures." Semin Cell Dev Biol **42**: 3-12.
- Krohn, K. A., J. M. Link, et al. (2008). "Molecular imaging of hypoxia." J Nucl Med **49 Suppl 2**: 129S-148S.
- Lee, J. M., M. C. Grabb, et al. (2000). "Brain tissue responses to ischemia." J Clin Invest **106**(6): 723-731.

- Lee, K. R., A. L. Betz, et al. (1996). "The role of the coagulation cascade in brain edema formation after intracerebral hemorrhage." Acta Neurochir (Wien) **138**(4): 396-400; discussion 400-391.
- Lifshitz, J., H. Friberg, et al. (2003). "Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus." J Cereb Blood Flow Metab **23**(2): 219-231.
- Liszczyk, T. M., E. T. Hedley-Whyte, et al. (1984). "Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain." Acta Neuropathol **65**(2): 150-157.
- Lok, J., P. Gupta, et al. (2007). "Cell-cell signaling in the neurovascular unit." Neurochem Res **32**(12): 2032-2045.
- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, et al. (1989). "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." Stroke **20**(1): 84-91.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lundy, E. F., B. S. Solik, et al. (1986). "Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils." J Pharmacol Methods **16**(3): 201-214.
- Ma, Y., A. Zechariah, et al. (2012). "Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke." J Neurosci Res **90**(10): 1873-1882.
- MacManus, J. P., A. M. Buchan, et al. (1993). "Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain." Neurosci Lett **164**(1-2): 89-92.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.
- Martinez-Estrada, O. M., E. Rodriguez-Millan, et al. (2003). "Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability." Eur J Neurosci **18**(9): 2538-2544.
- Miriam Marañón Cardonne, L. P. F., Amanda Moya Gómez (2014). "La neuroprotección en la isquemia cerebral: Potencialidades del campo magnetico." Investigación y Saberes Vol. III (No. 1): 1-20.
- Morin-Brureau, M., A. Lebrun, et al. (2011). "Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways." J Neurosci **31**(29): 10677-10688.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study." Lancet **349**(9064): 1498-1504.
- Murray, C. J., T. Vos, et al. (2012). "Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet **380**(9859): 2197-2223.
- Nakagomi, T., S. Kubo, et al. (2015). "Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells." Stem Cells **33**(6): 1962-1974.
- Neufeld, G., O. Kessler, et al. (2002). "The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF." Adv Exp Med Biol **515**: 81-90.
- Ogunshola, O. O., W. B. Stewart, et al. (2000). "Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain." Brain Res Dev Brain Res **119**(1): 139-153.

- Phinikaridou, A., M. E. Andia, et al. (2012). "Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent." *Circulation* **126**(6): 707-719.
- Posada-Duque, R. A., G. E. Barreto, et al. (2014). "Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity." *Front Cell Neurosci* **8**: 231.
- Ravagnan, L., S. Gurbuxani, et al. (2001). "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor." *Nat Cell Biol* **3**(9): 839-843.
- Rehncrona, S., L. Mela, et al. (1979). "Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia." *Stroke* **10**(4): 437-446.
- Rousselet, E., J. Kriz, et al. (2012). "Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining." *J Vis Exp*(69).
- Ruffer, C. and V. Gerke (2004). "The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions." *Eur J Cell Biol* **83**(4): 135-144.
- Sacco, S., C. Marini, et al. (2006). "A population-based study of the incidence and prognosis of lacunar stroke." *Neurology* **66**(9): 1335-1338.
- Saito, K., K. Suyama, et al. (1996). "Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain." *Neurosci Lett* **206**(2-3): 149-152.
- Saria, A. and J. M. Lundberg (1983). "Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues." *J Neurosci Methods* **8**(1): 41-49.
- Seshadri, S., A. Beiser, et al. (2006). "The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study." *Stroke* **37**(2): 345-350.
- Shiraishi, K. and R. P. Simon (1989). "A model of proximal middle cerebral artery occlusion in rat." *J Neurosci Methods* **30**(2): 169-174.
- Speetzen, L. J., M. Endres, et al. (2013). "Bilateral common carotid artery occlusion as an adequate preconditioning stimulus to induce early ischemic tolerance to focal cerebral ischemia." *J Vis Exp*(75): e4387.
- Sudlow CL, W. C. (1997). "Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration." *Stroke*.
- Sun, Y., K. Jin, et al. (2003). "VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia." *J Clin Invest* **111**(12): 1843-1851.
- Tamura, A., D. I. Graham, et al. (1981). "Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion." *J Cereb Blood Flow Metab* **1**(1): 53-60.
- Tominaga, T., S. Kure, et al. (1993). "Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain." *Brain Res* **608**(1): 21-26.
- Truelsen T, B. S., Mathers C. (2006). "The global burden of cerebrovascular disease." *WHO Discussion Paper*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Tureyen, K., R. Vemuganti, et al. (2004). "Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques." *J Neurosci Methods* **139**(2): 203-207.
- Ujii, M., D. L. Dickstein, et al. (2003). "Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model." *Microcirculation* **10**(6): 463-470.

- Uyama, O., N. Okamura, et al. (1988). "Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence." J Cereb Blood Flow Metab **8**(2): 282-284.
- Vajda, F. J. (2002). "Neuroprotection and neurodegenerative disease." J Clin Neurosci **9**(1): 4-8.
- Wang, Y., E. Kilic, et al. (2005). "VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena." Brain **128**(Pt 1): 52-63.
- Wang, Y. Q., X. Guo, et al. (2007). "VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion." J Neurosci Res **85**(1): 73-82.
- Warlow, C. P. (1998). "Epidemiology of stroke." Lancet **352**(Suppl 3):(SIII): 1-4.
- WHO (1988). "The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators." J Clin Epidemiol **41**(2): 105-114.
- Willis, C. L., L. Leach, et al. (2004). "Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss." Glia **48**(1): 1-13.
- Zhang G, G. E. (2014). Method and kit for measuring cell activity and application of kit, Google Patents.
- Zhang, W., B. Wang, et al. (2012). "The effect of ischemic post-conditioning on hippocampal cell apoptosis following global brain ischemia in rats." J Clin Neurosci **19**(4): 570-573.
- Zucchi, R. and S. Ronca-Testoni (1997). "The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states." Pharmacol Rev **49**(1): 1-51.

ANEXOS

Preparación de soluciones

Preparación de NaCl 0.9%

- Pesar 9 g de NaCl, en la balanza semianalítica.
- Pasarlos a un matraz aforado de 1 L.
- Agregar agua en suficiente cantidad para disolver la sal.
- Llevar al aforo con agua desionizada.
- Transferir la solución a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.

Preparación de PB

- Pesar 5.2 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 23 g de fosfato de sodio dibásico anhidro.
- Pasar las sales a un vaso de precipitados y disolver en agitación y calentamiento.
- Una vez disueltas, pasar a un matraz aforado de un litro, y completar con agua desionizada.
- Transferir la solución a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.
- De esta solución (0.2 M) tomar 250 mL y llevarlos a 500 mL con agua desionizada para obtener PB 0.1 M

Preparación de PBS 1X

- Para preparar 500 mL de PBS 10 X, pesar 40 g de NaCl, 1 g de KCl, 7.2g de Na_2HPO_4 , y 1.2 g de KH_2PO_4 y pasarlos a un vaso de precipitados.
- Agregar un volumen aproximado de 400 mL de agua desionizada y disolver completamente estas sales con agitación magnética (y calor si se desea acelerar el proceso).
- Pasar esta solución a un matraz volumétrico de 500 mL y llevar a la marca de aforo con agua desionizada.
- Transferir esta solución a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.
- Para obtener PBS 1X aforar 50 mL de PBS 10 X a 500 mL con agua desionizada.

Preparación de Azul de Evans 2% en Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.9%)

- Para preparar 10 mL de la solución del tinte, pesar 0.2 g de Azul de Evans con exactitud (± 0.0001 g) en la balanza analítica.
- Pasar esta cantidad a un matraz aforado de 10 mL.
- Disolver, y completar el volumen de aforo con Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.9%).
- Guardar la solución en un frasco limpio, y seco debidamente etiquetado.
- *Evitar el contacto con el azul de Evans ya que es un cancerígeno potencial. Si entrara en contacto con la piel, enjuague con abundante agua.

Preparación de Ácido tricloroacético (TCA) 60 % en Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.9%).

- Para preparar 100 mL, se pesan 60 g de TCA con exactitud (± 0.0001 g) en la balanza analítica.
- Se traspasa esta cantidad a un matraz aforado de 60 mL.
- Se disuelve, y lleva al volumen de aforo con Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.9%).
- Almacenar la solución en un frasco limpio, y seco debidamente etiquetado.

Preparación de TTC al 2% en PBS

- Para preparar 7 ml, pesar 0.14 g de TTC (guardado a 4°C y protegido de la luz), en un tubo "Falcon" de 15 ml sin tapa.
- Cubrir el tubo "Falcon" con papel aluminio y aforar a 7 mL con el PBS 1X preparado previamente, disolver en el vortex.
- Mantener la solución protegida de la luz en incubación a 37 °C hasta el momento de su utilización donde se verterá 1 mL en cada pozo de la placa.

Preparación de sacarosa al 30% en PB 0.1 M

- Pesar 30 g de sacarosa.
- Pasar la sacarosa a un vaso de precipitados y disolverla en un volumen apropiado (50 mL aprox. de PB 0.1M) con agitación y calentamiento.
- Una vez disuelta completamente, trasvasar la solución a un matraz aforado de 100 mL.
- Llevar a la marca de aforo con PB 0.1M.
- Guardar la solución en un frasco limpio, y seco debidamente etiquetado a 4°C.

Preparación de PFA 4% en PB

- Pesar 2g del polvo de PFA en un tubo "Falcon" de 50 mL.
- Poner a calentar agua en el microondas (2 min aprox.) a una temperatura no superior de los 60 °C.
- Verter 25 mL de esta agua, en el tubo que contiene el PFA (realizar esto en la campana de extracción)
- Agregar ¼ de parte de lenteja de NaOH.
- Agitar en el vortex, y si es necesario, agregar un poco de sosa en solución para disolver completamente.
- Una vez que la solución se encuentre clara y traslúcida, agregar PB 0.2M hasta completar los 50 mL y de esta manera obtener el PFA en PB 0.1 M.
- Verificar que el pH se encuentre entre 7 y 8 (7.4 aprox.) por medio de tiras indicadoras de pH.
- Mantener la solución a 4°C*.

Preparación de violeta de cresilo 0.1%

- Pesar 0.1 g de acetato de violeta de cresilo (cresil fast violet)
- En la campana de extracción, agregar 100 mL de agua desionizada a un vaso de precipitados.
- Ir agregando lentamente el colorante en agitación continua magnética y con calor (que no sobrepase los 60°C).
- Agregar 10 gotas de ácido acético glacial
- Seguir con la agitación y el calentamiento hasta que ya no se disuelva más violeta de cresilo.
- Preparar un sistema de filtración por gravedad y filtrar la solución (cambiar el papel filtro cada 25 mL aprox. de solución, pues esta satura muy rápidamente los poros del papel)
- Trasvasar la solución ya filtrada a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.

Preparación de etanol al 70%

- Para preparar 100 mL, medir con una probeta 70 mL de etanol absoluto (100%) y pasarlos a una matraz aforado de 100 mL.
- Llevar al aforo con agua desionizada (30 mL).
- Guardar la solución en un frasco limpio, y seco debidamente etiquetado.

Preparación de etanol al 95%

- Para preparar 100 mL, medir con una probeta 95 mL de etanol absoluto (100%) y pasarlos a una matraz aforado de 100 mL.
- Llevar al aforo con agua desionizada (5 mL)
- Guardar la solución en un frasco limpio, y seco debidamente etiquetado.

Preparación de HBSS 1X

- Pesar 0.4 g de KCl, 0.06 g KH_2PO_4 , 0.35 g de NaHCO_3 8 g de NaCl, 1 g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ en la balanza semianalítica y 0.0480 g de Na_2HPO_4 en la balanza analítica.
- Pasarlos a un matraz aforado de 1 L.
- Agregar agua desionizada en suficiente cantidad para disolver las sales.
- Aforar.
- Trasferir la solución a un frasco limpio y seco debidamente etiquetado.

Preparación de buffer crioprotector

- Agregar 10 g de PVP-40 a 0.1M PB, agitar y disolver.
- Agregar lentamente 300 g de sacarosa.
- Agregar 300 mL de etilenglicol.
- Aforar a 1 L con PB 0.1 M.
- Almacenar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en un frasco limpio y etiquetado.

2015 - "Astrocyte-derived exosomes reduce infarct volume and reduce neurological alterations in a rat model of ischemic stroke" at the Neuroscience Congress 2015 in conjunction with Society for Neuroscience (SfN), 17-21 october, McCormick Place in Chicago, USA.

Astrocyte-derived exosomes reduce infarct volume and reduce neurological alterations in a rat model of ischemic stroke
 Berenice N. Bernal Vicente, Edgar J. Hernández Ponce, Alberto Ramos Morales, Luis B. Tovar-y-Romo 35417
 Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D. F. C.P. 04510, México. Tel.- +52-55-5624 5734; tovar@ifc.unam.mx



Introduction

Ischemic stroke is the third cause of death and permanent disabilities worldwide. Given the lack of effective therapies for this type of acute insult to the brain, there is an urgent need for novel strategies to reduce infarct volume and neurological alterations. One of the main mediators of the endogenous response to stroke is vascular endothelial growth factor (VEGF), which is secreted by astrocytes and has been shown to reduce infarct volume in experimental models in vivo when administered intraperitoneally. Here, we explored how astrocytes contribute to stroke recovery after ischemia by releasing exosomes containing signaling molecules of interest. For this, we cultured rat primary cortical astrocytes and conditioned medium (CM) from these cells. We found that astrocyte-derived exosomes reduced infarct volume in rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) 30 min after reperfusion. We found that astrocyte-derived exosomes reduced infarct volume, as assessed by triacetic acid-stained coronal sections, although there was no reduction in neurological symptoms 24 h after stroke. We also studied the effect of astrocyte-derived exosomes on the reduction of blood brain permeability, which is known to play an important role in the development of post-ischemic edema that may affect stroke recovery.

Methods

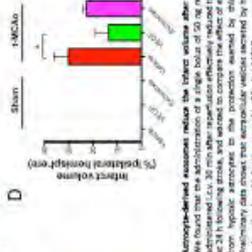
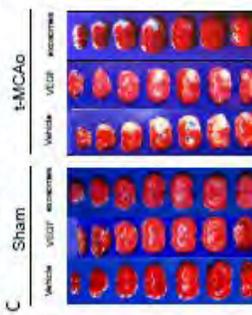
We induced ischemic stroke in male adult Wistar rats by the permanent ligation of a nylon suture through the anterior middle cerebral artery, with it occluding the origin of the middle cerebral artery, when it blocked blood flow in the primary cortex and basal ganglia for 90 min. After the transient occlusion, the sutured filament was removed allowing blood reperfusion, which is known to further increase tissue damage. We monitored brain blood perfusion by Doppler laser flowmetry and determined the intensity of perfusion throughout 90 min of reperfusion. We administered astrocyte-derived exosomes intraperitoneally 30 min after reperfusion. Rats were evaluated at 24 h post-stroke for neurological impairment and also sacrificed for tissue collection to evaluate infarct volume and BBB alterations. This included brain sections, rat movement in a rotarod, and administration of Evans blue dye to assess albumin that does not cross the BBB. Infarct volume was measured by triacetic acid-stained coronal sections and stained with tetramethylrhodamine (TRITC) to assess brain viability.

Results

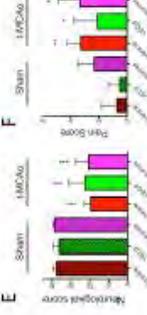
Exosomes were isolated from cultured primary rat astrocytes subjected to hypoxia by incubation in a 100% N₂ atmosphere for 4 h. Conditioned media were collected and exosomes were purified by ultracentrifugation. Exosomes were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and size analysis. Exosomes were administered at 100,000 µg/kg for 3 h. Exosome pulses was resuspended in PBS and protein content was quantified by BCA. An equal amount of exosome containing -400 µg of protein was injected i.v. in each experiment. Figure shows a representative example of exosomes. Exosomes were characterized by transmission electron microscopy. Exosome vesicles isolated by this method are within the size range of exosomes, typically 30-200 nm in diameter.



Fig. 1. Exosomes were isolated from cultured primary rat astrocytes subjected to hypoxia by incubation in a 100% N₂ atmosphere for 4 h. Conditioned media were collected by centrifugation and exosomes were purified by ultracentrifugation. Exosomes were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and size analysis. Exosomes were administered at 100,000 µg/kg for 3 h. Exosome pulses was resuspended in PBS and protein content was quantified by BCA. An equal amount of exosome containing -400 µg of protein was injected i.v. in each experiment. Figure shows a representative example of exosomes. Exosomes were characterized by transmission electron microscopy. Exosome vesicles isolated by this method are within the size range of exosomes, typically 30-200 nm in diameter.



Astrocyte-derived exosomes reduce the infarct volume after ischemic stroke. Exosomes were isolated from cultured primary rat astrocytes subjected to hypoxia by incubation in a 100% N₂ atmosphere for 4 h. Conditioned media were collected by centrifugation and exosomes were purified by ultracentrifugation. Exosomes were administered at 100,000 µg/kg for 3 h. Exosome pulses was resuspended in PBS and protein content was quantified by BCA. An equal amount of exosome containing -400 µg of protein was injected i.v. in each experiment. Figure shows a representative example of exosomes. Exosomes were characterized by transmission electron microscopy. Exosome vesicles isolated by this method are within the size range of exosomes, typically 30-200 nm in diameter.



In spite of the protection exerted on infarct volume, administration of VEGF or exosomes did not improve the neurological deficit at this time point (24 h) or reperfusion following stroke (not indicated).



A low dose of VEGF reduces astrocyte-derived exosomes of plasma. Exosomes were isolated from cultured primary rat astrocytes subjected to hypoxia by incubation in a 100% N₂ atmosphere for 4 h. Conditioned media were collected by centrifugation and exosomes were purified by ultracentrifugation. Exosomes were administered at 100,000 µg/kg for 3 h. Exosome pulses was resuspended in PBS and protein content was quantified by BCA. An equal amount of exosome containing -400 µg of protein was injected i.v. in each experiment. Figure shows a representative example of exosomes. Exosomes were characterized by transmission electron microscopy. Exosome vesicles isolated by this method are within the size range of exosomes, typically 30-200 nm in diameter.

Conclusions

Exosomes released by astrocytes after ischemic stroke may have the potential to reduce neurodegeneration caused by ischemic stroke. The mechanisms behind this neuroprotection are not clear, although, neuroprotection induced by exogenous VEGF after ischemic stroke is possibly mediated in part through the upregulation of microRNAs across the endothelial barrier of the neurovascular unit, the neuroprotective effect of astrocyte-derived exosomes seems to be independent from this mechanism.

UNAM (Grant A201313).

2015 - "Vascular Endothelial growth factor reduces alterations associated to blood-brain barrier disruption after ischemic stroke" at the 25th ISN-APSN Joint Biennial Meeting in conjunction with Australasian Neuroscience Society (ANS), 23-27 august, Cairns, Australia.



Vascular endothelial growth factor reduces alterations associated to blood-brain barrier disruption after ischemic stroke

Luis B. Tovar-y-Romo, Berenice Bernal-Vicente, Edgar Hernández-Ponce and Alfredo Cárdenas-Rivera

Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F, Mexico.

Introduction

Ischemic stroke is a leading cause of death and neurological disabilities worldwide for which no effective therapy exists. Brain injury in stroke appears either as infarct core, caused by blood flow blockage, or as penumbra, generated by cellular death at the core. In these regions the integrity of the blood-brain barrier (BBB) is lost allowing the entry of toxic molecules and activated cells from the peripheral immune system, which further contribute to impair tissue homeostasis leading to neuronal death and exacerbation of neurological decline. BBB dynamics are modulated by vascular endothelial growth factor (VEGF) that is known to induce vascular leakage and remodeling. Conversely, VEGF is also a potent neuroprotector in experimental models of stroke but the mechanisms for protection are not entirely understood. Here, we tested whether administration of recombinant VEGF during the reperfusion phase of stroke would modulate the permeability of BBB affecting tissue viability. For this we used the transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in the rat that allows focal blockage of brain blood flow followed by reperfusion in which we administered via i.c.v. different concentrations of exogenous recombinant VEGF and evaluated the effects on infarct volume, neurological outcome and BBB integrity and permeability.

Results

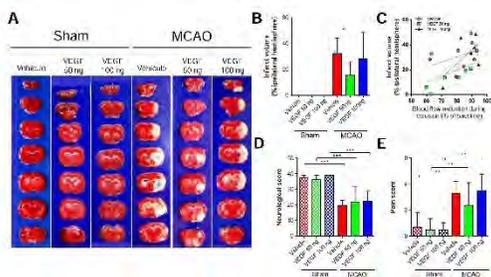


Figure 1. Low doses of VEGF reduce the infarct volume after ischemic stroke. It has been previously reported that VEGF induces protection against ischemic stroke but the level of protection varies depending on several factors including the way and time of administration. We found that the administration of a single bolus of 50 ng recombinant VEGF administered i.c.v. 30 min after reperfusion effectively reduced the infarct volume at 24 h following stroke, but a higher dose does not seem to improve protection but to prevent it (A-B). However, results greatly vary within each group, an effect that is most likely due to the intrinsic variability of the MCAO model (C). In spite of the protection exerted on infarct volume, VEGF did not improve the neurological decline at this short (24 h) time point following stroke (D), nor reduced pain (E).

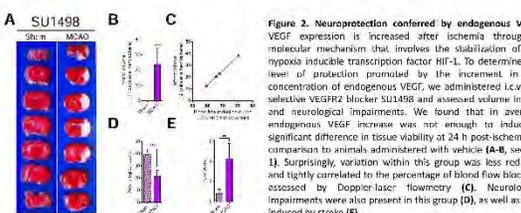


Figure 2. Neuroprotection conferred by endogenous VEGF. VEGF expression is increased after ischemia through a molecular mechanism that involves the stabilization of the hypoxia inducible transcription factor HIF-1. To determine the level of protection promoted by the increment in the concentration of endogenous VEGF, we administered i.c.v. the selective VEGFR2 blocker SU1498 and assessed volume infarct and neurological impairments. We found that in average, endogenous VEGF increase was not enough to induce a significant difference in tissue viability at 24 h post-ischemia in comparison to animals administered with vehicle (A-B, see Fig 1). Surprisingly, variation within this group was less reduced and tightly correlated to the percentage of blood flow blockage assessed by Doppler laser flowmetry (C). Neurological impairments were also present in this group (D), as well as pain induced by stroke (E).

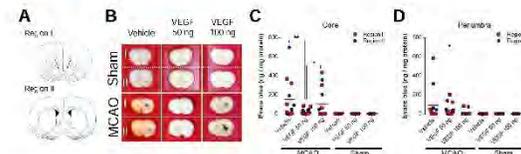


Figure 3. A low dose of VEGF reduces stroke-induced extravasation of plasma molecules through the BBB. It has been extensively reported that ischemia induces alterations in the permeability of BBB and that this effect might mediate some neurodegenerative processes that occur after stroke. We sought to determine if the low dose of VEGF that resulted neuroprotective would modulate this process. We analyzed the extension of Evans blue penetration in the brain parenchyma (streaked brain areas indicated in A) at 24 h following ischemia-reperfusion and found that 50 ng VEGF significantly reduced Evans blue extravasation at the core of infarction, whereas the higher dose did not differ from the control group administered with vehicle (B-C). The extension of Evans blue penetration in the area of penumbra was less intense in all groups (B and D).

Methods

We induced ischemic stroke in male adult Wistar rats by the intraluminal insertion of a nylon monofilament through the common carotid artery until it reached the origin of the middle cerebral artery, where it blocked blood flow in the ipsilateral cortex and basal ganglia for 90 min. After this transient occlusion, the monofilament was removed allowing blood reperfusion, which is known to further increase tissue damage. We monitored brain blood perfusion by Doppler laser flowmetry and determined the intensity of perfusion blockage. After 30 min of reperfusion, we administered 50 or 100 ng of recombinant VEGF (Sigma), vehicle or the VEGF receptor 2 (VEGFR2) inhibitor SU1498 (5 µg/µl; Calbiochem) by means of intracerebral injection in the contralateral ventricle. Twenty-four h later, rats were evaluated to assess neurological impair and then sacrificed for tissue collection to analyze infarct volume and BBB alterations. Thirty minutes before sacrifice, rats received an i.v. administration of Evans blue that binds to serum albumin that does not cross the intact BBB. The rats were transcardially perfused with Hank's balanced-saline solution (HBSS) to remove all traces of Evans blue that were not extravasated. Brains were collected and sliced in 2 mm thick sections and stained with tetrazolium-chloride to assess tissue viability. For quantification of extravasated Evans blue, tissue sections from ischemic core or penumbra were dissected out and homogenized, proteins and membranes were precipitated by processing tissues with trichloroacetic acid and the aqueous phase of the homogenate containing Evans blue was collected and analyzed in a plate reader (BioTek) to determine the intensity of fluorescent signal at 620 nm. In a different set of experiments, rats subjected to the same treatments were sacrificed and transcardially perfused with ice cold isotonic saline followed by 4% paraformaldehyde. Brains were collected, post fixed and sliced in 40 µm sections in a cryostat. Thin sections were used for immunofluorescence experiments to determine the integrity of BBB tight junctions by analyzing Claudin-5 and for assessing the fluorescence of Evans blue. Here we also show preliminary data of the vascular leakage in the brain of a stroke rat by *in vivo* two-photon imaging. For this, the rat was subjected to craniotomy and a small glass window was placed on top of the dura, then MCAO was performed. Twenty-four h later, the stroke rat and an intact control received an i.v. administration of FITC-coupled dextran and were imaged under two-photon microscope (Zeiss; 780 nm excitation) for 30 min. Images are maximum projections of optical slices obtained for a total of 1 micron.

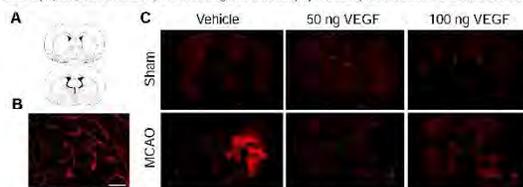


Figure 4. Evans blue extravasation in basal ganglia following MCAO. Despite the occlusion of middle cerebral artery affects both the ipsilateral cerebral cortex and basal ganglia we observed that Evans blue extravasation only occurred in the striatum of infarcted rats that did not receive the low dose of VEGF. Therefore, we further characterized this effect by analyzing the extent of Evans blue signal in fixed thin brain sections evaluating the fluorescence of the molecule when excited at 620 nm. (A) Diagrams show the regions where Evans blue penetration was most abundant. (B) Intact striatal microvasculature stained with Evans blue in a rat that was not transcardially perfused with HBSS, note well defined blood vessels without any signs of plasma molecules extravasation. (C) Evans blue fluorescence in thin brain sections of animals from the indicated groups. Note the extensive extravasation of plasma molecules around the infarcted area in the striatum of an animal that received vehicle and the lack of signal in the animals receiving VEGF at the low doses. In the ventricular area of each section the distinctive mark of the choroid plexus that lack BBB can be appreciated.

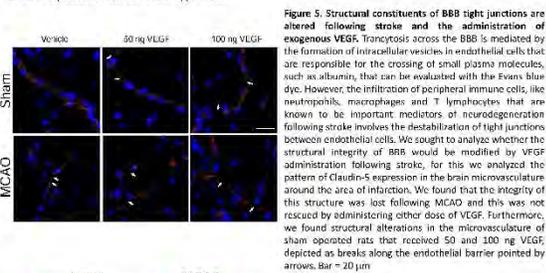


Figure 5. Structural constituents of BBB tight junctions are altered following stroke and the administration of exogenous VEGF. Transcytosis across the BBB is mediated by the formation of intracellular vesicles in endothelial cells that are responsible for the crossing of small plasma molecules, such as albumin, that can be evaluated with the Evans blue dye. However, the infiltration of peripheral immune cells, like neutrophils, macrophages and T lymphocytes that are known to be important mediators of neurodegeneration following stroke involves the destabilization of tight junctions between endothelial cells. We sought to analyze whether the structural integrity of BBB would be modified by VEGF administration following stroke, for this we analyzed the pattern of Claudin-5 expression in the brain microvasculature around the area of infarction. We found that the integrity of this structure was lost following MCAO and this was not rescued by administering either dose of VEGF. Furthermore, we found structural alterations in the microvasculature of sham operated rats that received 50 and 100 ng VEGF, depicted as breaks along the endothelial barrier pointed by arrows. Bar = 20 µm

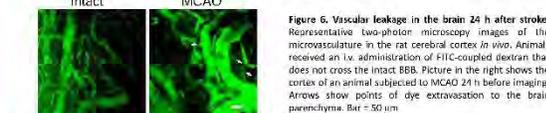


Figure 6. Vascular leakage in the brain 24 h after stroke. Representative two-photon microscopy images of the microvasculature in the rat cerebral cortex *in vivo*. Animals received an i.v. administration of FITC-coupled dextran that does not cross the intact BBB. Picture in the right shows the cortex of an animal subjected to MCAO 24 h before imaging. Arrows show points of dye extravasation to the brain parenchyma. Bar = 50 µm

Conclusions

Neuroprotection induced by low doses of exogenous VEGF after ischemic stroke is possibly mediated in part through the suppression of transcytosis across the endothelial barrier of the neurovascular unit. The neuroprotective effect of VEGF however cannot be entirely attributed to the maintenance of an intact barrier since this trophic factor induces by itself alterations in the tight junction structure of the BBB, which constitutes a different mechanism for extravasation of blood elements to the brain parenchyma. This work was supported by the Committee for Aid and Education in Neurodegeneration of the International Society for Neurochemistry Grant Category C to LBTR, The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, (Grant 213542) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico - UNAM (Grant IA201315).