



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# FACULTAD DE PSICOLOGÍA

EFFECTOS DE LA AGMATINA COMO NEUROPROTECTOR FARMACOLÓGICO, Y SU PAPEL EN LAS ALTERACIONES DE CONCENTRACIÓN MICROGLIAL EN CA1 TRAS LA INDUCCIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA.

## TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA

**MARTHA LISBETH MIRANDA MOSQUEDA**

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia Gómez Acevedo



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



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.

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	7
<b>Resumen</b> .....	8
<b>1. Antecedentes</b> .....	9
<b>1.1 Enfermedad vascular cerebral (EVC)</b> .....	9
1.1.1 Epidemiología .....	9
1.1.2 Clasificación de las EVC .....	10
<b>1.2 Isquemia cerebral</b> .....	11
1.2.1 Isquemia cerebral transitoria .....	12
1.2.2 Isquemia cerebral aguda .....	12
1.2.3 Vascularización cerebral .....	14
1.2.4 Fisiopatología de la isquemia cerebral aguda .....	16
1.2.5 Activación microglial .....	23
1.2.6 Signos, síntomas y cuadros clínicos de la isquemia cerebral aguda .....	25
<b>1.3 Modelos animales de investigación para Isquemia Cerebral</b> .....	28
1.3.1 Modelo de Isquemia Cerebral de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes (SSACC) .....	29
1.3.2 Consecuencias Neuroconductuales inducidas por el modelo de isquemia cerebral SSACC en ratones .....	30
<b>1.4 Fármacos Neuroprotectores</b> .....	31
1.4.1 Agmatina: ¿una nueva opción farmacológica? .....	33
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	36
<b>2.1 Justificación</b> .....	36
<b>2.2 Objetivo</b> .....	37
2.2.1 Objetivos específicos .....	37
<b>2.3 Hipótesis</b> .....	38
2.3.1 Hipótesis de trabajo .....	38
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	39
<b>3.1 Animales</b> .....	39
<b>3.2 Técnicas</b> .....	39
3.2.1 Inducción de isquemia cerebral aguda .....	39
3.2.2 Tratamiento farmacológico .....	40
3.2.3 Evaluación de déficits neuroconductuales característicos del modelo SSACC posterior a la segunda cirugía .....	41

<b>3.3 Estudios histológicos</b> .....	42
3.3.1 Perfusión .....	42
3.3.2 Técnica histológica de Doble Impregnación metálica de Pio Del Río Hortega	43
<b>3.4 Procedimiento Experimental</b> .....	44
<b>3.5 Análisis estadístico</b> .....	46
<b>3.6 Cronograma Experimental</b> .....	47
<b>4. Resultados</b> .....	48
4.1 Mortalidad .....	48
4.2 Perfil Neuroconductual .....	50
4.3 Conteo Microglial .....	57
<b>5. Discusión</b> .....	61
<b>6. Conclusiones</b> .....	69
<b>7. Referencias</b> .....	72

**LA IMPORTANCIA DE LAS RAÍCES DE UN ÁRBOL RECAE EN EL SOPORTE QUE ÉSTAS LE DAN, PUES HACEN POSIBLE SU VIDA, LE DAN FUERZAS PARA CRECER, LO ALIMENTAN, LO SOSTIENEN, Y LO MÁS DIFÍCIL Y EXTENUANTE... LO MANTIENEN CONECTADO A LA TIERRA, A SU ORIGEN Y NATURALEZA, SIN IMPEDIRLE CRECER HASTA TOCAR EL CIELO, PROVEYÉNDOLO DE FORTALEZA CON EL ABRAZO FIRME QUE LE PERMITE EXISTIR.**

*-A MIS PADRES.*

***“SIENTO EL CORAZÓN OPRIMIDO POR TODAS LAS  
COSAS QUE NO LLEGO A ENTENDER”***

*-RUDYARD KIPLING*

## AGRADECIMIENTOS

A quienes luchan a mi lado cada día desde el inicio de mi vida, y que han hecho esto posible con su apoyo e infinita dedicación. A mi Madre que pendiente de cada desvelo académico, vigila mi descanso y alimenta mis fuerzas para seguir adelante en cada aspecto de mi vida. A mi padre que me ha enseñado que con arduo trabajo, y apoyo de quienes nos aman es posible llegar tan lejos como se quiera. A ambos infinitas gracias por haber hecho de mi la mujer que ahora soy, son los mejores Profesores que pudieron haberme tocado en la vida pues de ustedes he aprendido todo lo que sé, me han forjado el carácter que me permite luchar por lo que creo y quiero. Este trabajo es el fruto del esfuerzo de ambos por sacarme adelante y aquí esta... dedicado a ustedes no el final del camino si no el inicio de la realización de sueños más grandes. Para ustedes, con respeto y amor. ¡Lo logramos!

A mi Alma Mater, la Universidad Nacional Autónoma de México que con tan solo 15 años me acogió en la Escuela Nacional Preparatoria No. 2 "Erasmus Castellanos Quinto", en donde aprendí que la grandeza del espíritu académico es poder compartir con los demás lo que se sabe. A la Facultad de Psicología por ayudarme a trazar el rumbo de mi vida y llevarme de la mano hasta la investigación básica, mi pasión. A la Facultad de Medicina quien me ha adoptado permitiéndome formar parte del Departamento de Farmacología en donde comenzó mi formación como investigadora y ratón de biblioteca, agradeciendo a este departamento el apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo, por brindarme su confianza y darme la oportunidad de incubar mis sueños de la mano de su experiencia, haciéndome parte de su equipo de trabajo. Gracias por darme un espacio en el que he podido aprender no solo procedimientos y técnicas experimentales sino también la importancia de trabajar en equipo y de encontrar en las demás personas el apoyo profesional que muchos han olvidado en el campo de la investigación. Doctora, le agradezco haber creído en mi trabajo y el haberme provisto de todo lo necesario para realizarlo, la guía, los consejos y los jalones de oreja, agradezco en demasía su accesibilidad para introducirme en diferentes campos de investigación permitiéndome complementar mi formación profesional. Seguimos en el camino Doctora Caramelo.

A mis hermanos. Mario, profesionalmente un ejemplo a seguir. Miguel, deseando ser una buena guía para ti, te dedico gran parte de este trabajo, esperando con ansias verte crecer y un día ser yo la que esté en los agradecimientos de tus grandes proyectos.

A Mis Abuelos. Mamá Yola, mi ejemplo a seguir, mis ganas de superarme y de ser la mejor, para que desde donde estés sigas orgullosa de mí. A mi papá Arturo, por estar al pie del cañón, preocuparse por mí y proveerme de las herramientas para realizar este proyecto, sin usted todo hubiera sido más difícil.

A ti mi compañero de vida, mejor amigo, y consejero, Alejandro Mendiola, gracias amor, porque además de tu apoyo incondicional, entraste al ruedo conmigo, eres el mejor asistente de cirugía "ratonil" que puede existir, con todo y la jefa histérica (yo) que te tocó, gracias por toda tu paciencia pero sobre todo, gracias por alimentar mis locos sueños y volverte parte de ellos, por dejarme e impulsarme a volar tan alto como jamás pensé, gracias por formar parte de mi vida, y de mis pasiones, gracias porque tú haces todo tan llevadero, y posible lo imposible.

Maestra Jaquelina Hernández gracias por ayudarme en esas tardes interminables de trabajo, por enseñarme de la A a la Z en el laboratorio de la vida real, y brindarme la oportunidad de compartir su espacio, alimentando mi espíritu investigador, entre otras muchas cosas, gracias por hacerme sentir parte de su equipo, por la amistad y confianza.

Doctora Leticia Parra gracias por todo el apoyo, la confianza y las enseñanzas, por mostrarme lo maravilloso que es el mundo celular, por la paciencia, y por motivarme a buscar cada vez cosas más grandes, por abrirme la puerta de su laboratorio y llevarme de la mano, por ampliar mis horizontes y regalarme nuevas experiencias, por enseñarme lo fascinante del mundo visto a través de un microscopio.

En el camino encontré a personas muy valiosas y profesionales de las cuales aprendí mucho y otras quienes me ayudaron para llevar a cabo mi objetivo. Doctora Ruth Jaimez, por enseñarme técnicas que complementaron mi formación como investigadora. Gracias por la paciencia y la dedicación. Al Doctor Edgar Centeno por su aporte para que la realización de este trabajo fuera posible, infinitas gracias.

A mis tíos Karina y Rive de quienes he recibido apoyo y cariño, aunque a la distancia, siempre al pie del cañón conmigo impulsando mis sueños, gracias a ambos por todo y por ser los mejores tíos del mundo.

A mis amigos: por enseñarme que esta vida se trata de sonreírle a la adversidad, y de siempre mirar adelante, Wendy Vázquez, por cantarme la canción del sillón de pensar a altas horas de la noche para hacerme más amena la noche de trabajo, por creer en mí y apoyarme en todo ¡Gracias Hermana!, y Enrique Martínez. Valeria y Vicente, mis hermanos de Facultad, gracias por su infinito apoyo y por ñoñear conmigo, por que hicieron de mi paso por la Facultad una de las más bonitas y enriquecedoras experiencias. Isabel Mendiola y Dany Monroy, por ayudarme con la revisión de este trabajo, pero principalmente por hacerme parte de su familia. Angélica Espina, gracias por impulsarme siempre a seguir adelante, por las palmaditas en la espalda cuando las cosas se ponían difíciles y por aquellas horas juntas en las que aprendí de ti que si se quiere se puede. Abel Martínez, te agradezco siempre estar a mi lado con los mejores consejos, y escuchar siempre mis problemas de “científicos”, por nunca dejarme sola, juntos vamos, gracias amigo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Mayra Flores, gracias por toda la ayuda para el diseño de éste proyecto, por la paciencia, y por soportar mis dramatizaciones en momentos de estrés, eres la mejor Mayis. David Hernández, gracias por insistir con la pregunta incomoda que me inspiraba a terminar “¿y cómo va la tesis?”, por la asistencia en las cirugías a las que pudiste acompañarme y por tu amistad. Marco Sotomayor, gracias por aclarar mis dudas existenciales, redirigir y conectar mis ideas para terminar este proyecto. Luis Méndez, gracias por tu apoyo en todo momento y por hacer de los ratos de estrés en el laboratorio una oportunidad para convertirnos en tortugas.

Gracias a mis ratoncitos de algodón.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACM: Arteria Cerebral Media

AIT: Ataque Isquémico Transitorio

AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-Hidroxil-5-Metil-4-Isoxazole-ácido Propiónico

ASi: Arteria Subclavia izquierda

ATP: Trifostato de Adenosina

eNOS: Óxido Nítrico Sintasa endotelial

EVC: Evento Vascular Cerebral

FSC: Flujo Sanguíneo Cerebral

IC: Infarto Cerebral

ICA: Isquemia Cerebral Aguda

ICT: Isquemia Cerebral Transitoria

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa inducida

i.p: intraperitoneal

NDSS: Neurological Disability Status Scale (Escala de Discapacidad Neurológica)

NMDA: Receptor N-Metil-D-Aspartato

nNOS: Óxido Nítrico Sintasa neuronal

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido

ONOO<sup>-</sup>: Anión Peroxinitrito

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SNC: Sistema Nervioso Central

SSACC: Seccionamiento Secuencial de Arterias Carótidas Comunes

## **RESUMEN**

En el año 2008 la enfermedad vascular cerebral (EVC) ocupó el tercer lugar entre las causas de mortalidad. La isquemia cerebral forma parte de estas enfermedades, consiste en la reducción transitoria o permanente en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) limitada al territorio de una arteria cerebral importante. En la mayoría de los casos, ésta reducción es causada por la oclusión de una arteria cerebral, ya sea por un émbolo o por trombosis local y puede tener manifestaciones temporales o permanentes, lo cual implica un daño neuronal irreversible. Una vez que existe oclusión de un vaso cerebral con la consecuente obstrucción del FSC, se desencadena una cascada de eventos bioquímicos que inicia con la pérdida de energía y termina en muerte neuronal. Los mecanismos patógenos más importantes en la cascada de muerte neuronal que se desemboca incluyen periinfarto, despolarización membranal, lesión mitocondrial, muerte celular programada, e inflamación. Dichos procesos de inflamación se acompañan de la infiltración de leucocitos, especialmente neutrófilos, en el parénquima cerebral lo cual contribuye al daño cerebral observado después de la isquemia.

La Agmatina es una amina biógena sintetizada por la arginina descarboxilasa, la cual forma parte de la membrana mitocondrial celular, y ha sido descrita como un agente neuroprotector con propiedades anti-inflamatorias, sin embargo, su función en el cerebro no se conoce totalmente. En este trabajo se buscó comprobar si la Agmatina es un potencial agente farmacológico neuroprotector, y antiinflamatorio contra la Isquemia cerebral inducida con el Modelo SSACC.

Nuestros resultados histológicos y conductuales, muestran efectos neuroprotectores en cuanto a la disminución de déficits neurológicos y reducción de reactividad microglial se refiere, los resultados arrojan datos importantes que pueden dar paso a la ampliación de esta línea de investigación.

### **Palabras clave:**

Isquemia cerebral aguda, Neuroprotección, Agmatina, Microglía.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Enfermedad vascular cerebral (EVC).**

Las enfermedades vasculares cerebrales o EVC, son trastornos clínicos patológicos del sistema nervioso central (SNC) que se producen como consecuencia del compromiso de los vasos que lo irrigan (Hospital General de México, 2011), lo cual produce isquemia y alteraciones del metabolismo celular (Arana Chacón, Uribe Uribe, Muñoz, Salinas Durán , & Celis Mejía, s.f), esta disfunción se debe a alteraciones circulatorias por la oclusión, transitoria o definitiva del árbol arterial encefálico determinando o una deficiencia funcional y vital en el territorio afectado (Hospital General de México, 2011). Las EVC se caracterizan por un rápido desarrollo de sus signos y/o síntomas neurológicos focales o globales, que persisten por más de 24 horas, sin otra causa aparente que el origen vascular. Este tipo de alteraciones cerebrovasculares causan secuelas y en algunos casos la muerte (Arauz & Ruíz Francob, 2012; Arana Chacón, et al. s.f; Silva, Zarruk, Quintero, Arenas, Rueda Clausen, Silva & Estupiñán, 2006).

La enfermedad cerebrovascular aguda (o ictus), engloba de forma genérica a un grupo de trastornos que incluyen la isquemia cerebral, la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea (Martínez Vila, Murie Fernández, Pagola, & Irimia, 2011).

#### **1.1.1 Epidemiología**

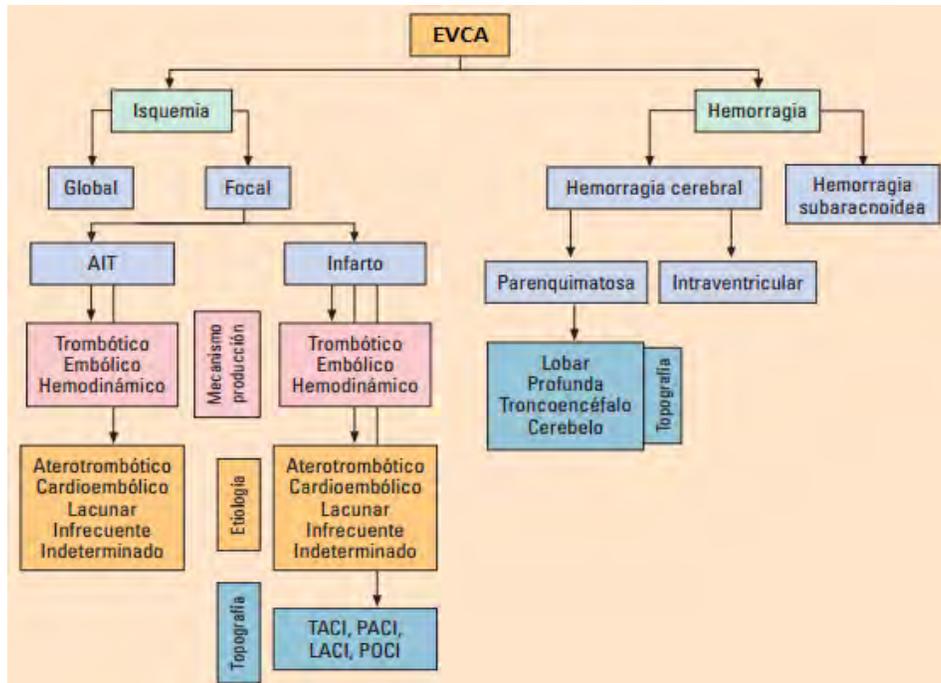
Las EVC representan un problema de salud pública en México, con incremento en la tasa de defunción de 25.2% en el año 2000 a 28.3% por cada 100,000 habitantes en 2008. Se ha estimado que ocurren alrededor de 230 casos de EVC por cada 100,000 habitantes mayores de 35 años y una prevalencia de 8 casos por cada 1,000 habitantes (Cantú Brito, et al., 2011). En el año 2008 en nuestro país las EVC ocuparon el tercer lugar entre la causas de mortalidad, dando cuenta de más de 30,000 defunciones en ese año (Chiquete, et al., 2012). El

envejecimiento de la población y un estilo de vida poco saludable han hecho que las EVC sean la principal causa de discapacidad en adultos ratificándose en año 2012 como la tercer causa de muerte en México con cerca de 150 mil decesos por año provocando que en nuestro país se aprecie un fenómeno en ascenso de la incidencia de EVC, también ocasionado por la creciente frecuencia de factores de riesgo, mientras que en países desarrollados la mortalidad por EVC ha mostrado un patrón descendente (Arauz, 2012; Chiquete, et al., 2012; Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015).

La prevalencia de infartos cerebrales se encuentra en aumento debido a que el 80% de los casos se relacionan con obesidad, diabetes, hipertensión arterial, cardiopatías, colesterol, triglicéridos elevados; sin embargo, también existen otros factores de riesgo poco conocidos y diagnosticados como la fibrilación auricular, la cual se define como una arritmia cardiaca frecuente en adultos que afecta a más de un millón de mexicanos (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2012). La edad, el sexo y factores modificables como la dieta, el consumo de cigarrillo y alcohol también son un factor de riesgo, y aunque afecta a todos los estratos de la población, su aparición se incrementa a partir de los 55 años (Fernández Gómez, et al., 2008; Rodríguez Acosta, Campo Batueca, Sarduy Ramos, & Baez Medina, 2004). De acuerdo a proyecciones de la Organización Mundial de la Salud, es posible que para el año 2020 las EVC sean la principal causa de muerte en nuestro país.

### **1.1.2 Clasificación de las EVC**

Las enfermedades vasculares cerebrales suelen dividirse en función de su naturaleza obteniendo así dos grandes grupos, isquémicas y hemorrágicas (Martínez Vila, et al., 2011; Fig.1).



**Figura 1.** Clasificación de las enfermedades Vasculares Cerebrales Agudas (EVCA) o ictus según su naturaleza. AIT: ataque isquémico transitorio; LACI: infarto lacunar; PACI: infarto parcial de la circulación anterior; POCI: infarto de la circulación posterior; TACI: infarto completo de la circulación anterior (tomado y modificado de Martínez Vila, et al., 2011).

Las hemorrágicas son consecuencia de la rotura de un vaso dando lugar a una concentración hemática en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoide (Arauz, et al., 2012). De acuerdo con Pedraza (2002), dichos eventos hemorrágicos constituyen entre el 10 y el 15% de las EVC, prevaleciendo en personas hipertensas mayores de 50 años de edad (Arana Chacón, et al. s.f; Martínez Vila, et al., 2011).

## 1.2 Isquemia cerebral

La isquemia cerebral representa entre el 70 y el 85% de los EVC, y es la consecuencia de una reducción transitoria o permanente en el FSC limitada al territorio de una arteria cerebral importante. La isquemia puede afectar solamente una zona del encéfalo (isquemia focal); o puede comprometer todo el encéfalo

simultáneamente (isquemia global) como sucede en un paro cardiaco o casos de hipotensión grave (Martínez Vila, et al., 2011).

La reducción del flujo sanguíneo, en la mayoría de los casos, es causada por la oclusión de una arteria cerebral, ya sea por un émbolo o por trombosis local, (Dirnagl, Iadecola, & Moskowitz, 1999) y puede tener manifestaciones transitorias o permanentes, lo cual implica un daño neuronal irreversible (Arauz, et al., 2012).

Se habla de isquemia cerebral transitoria (ICT) cuando los síntomas/signos provocados por la isquemia cerebral se revierten por completo sin que haya infarto agudo asociado, o de isquemia cerebral aguda (ICA) cuando el déficit neurológico focal produce una necrosis tisular que se observa en neuroimagen (Martínez Vila, et al., 2011).

### **1.2.1 Isquemia cerebral transitoria**

La Isquemia Cerebral Transitoria (ICT) se define como episodios de déficit neurológico focal, que tienen una duración inferior a 24 horas y que son consecuencia de la isquemia cerebral, en los cuales no existe daño neuronal permanente (Arana Chacón, et al., s.f). La propuesta actual para definir la ICT establece un tiempo de duración de los síntomas no mayor a 60 min, con recuperación espontánea, *ad-integrum* y estudios de imagen (preferentemente resonancia magnética) sin evidencia de lesión. Estudios recientes muestran que los pacientes con ICT tienen mayor riesgo de desarrollar una ICA en las 2 semanas posteriores (Arauz, et al., 2012).

### **1.2.2 Isquemia cerebral aguda**

La ICA resulta de la interrupción abrupta del flujo sanguíneo (Pedraza, 2002), se produce cuando la isquemia cerebral es lo suficientemente prolongada en el tiempo como para producir un área de necrosis tisular, presentándose déficits neurológicos con una duración superior a 24 horas, aun cuando en menos tiempo se puede observar la lesión isquémica evidenciándola en estudios de neuroimagen (Díez Tejedor, Del Brutto, Álvarez Sabin, Muñoz & Abiusi, 2001; Martínez Vila, et

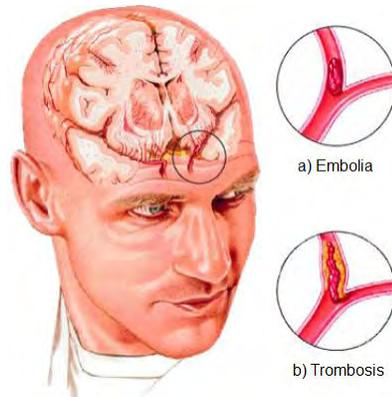
al., 2011). En comparación con la ICT en la ICA las consecuencias son permanentes e incluso puede ocasionar la muerte (Arauz, et al., 2012). La ICA puede ser clasificada de acuerdo a su mecanismo de producción el cual puede ser trombótico, embólico o hemodinámico. (Díez Tejedor, et al., 2001; Martínez Vila, et al., 2011).

En caso del trombótico existe una estenosis u oclusión de una arteria cerebral intra o extracraneal (Fig.2). El infarto trombótico ocurre generalmente cuando un trombo crece sobre una placa aterosclerótica u otra lesión vascular (Díez Tejedor, et al., 2001). La aterosclerosis, es la acumulación de depósitos grasos y con frecuencia es responsable de la formación de dichos coágulos (Reséndiz, 2010). En algunas circunstancias el infarto trombótico puede ser precipitado debido a un estado hipercoagulable (Alcaraz Moreno, 2002).

En cuanto al mecanismo embólico, la oclusión ocurre en una arteria y es causada por un émbolo distal a un punto donde exista un adecuado flujo colateral (Díez Tejedor, et al., 2001; Fig. 2); es decir, el coágulo que bloquea se origina en alguna parte alejada del cerebro (Reséndiz, 2010). El émbolo se origina proximalmente; puede ser arterio- arterial (el cual se desprende un trombo de la pared arterial e impacta distalmente al ser arrastrado por la corriente sanguínea al cerebro, el coágulo llega a un punto en el que es lo suficientemente estrecho como para no poder continuar y tapa el vaso sanguíneo, cortando el abastecimiento de sangre, este bloqueo súbito se llama embolia) (Reséndiz, 2010), o cardíaco (procedente de la circulación venosa pasa al corazón izquierdo a través de una comunicación derecha- izquierda) (Díez Tejedor, et al., 2001).

Por otro lado en la ICA causada por el mecanismo hemodinámico, el evento ocurre cuando la perfusión global cerebral está críticamente disminuida, debido a una hipotensión arterial importante, y el flujo compensatorio colateral es insuficiente. Este tipo de evento se favorece si coexiste una estenosis grave o una oclusión arterial (Martínez Vila, et al. 2011; Díez Tejedor et al., 2001). Dichas oclusiones suelen producirse en el área limítrofe entre dos territorios arteriales principales. Se denominan también infartos frontera o de último prado. Las localizaciones habituales son: entre la arteria cerebral media (ACM) y la anterior, entre la ACM y

la posterior, y entre los territorios superficial y profundo de la misma arteria (Díez Tejedor, et al., 2001).

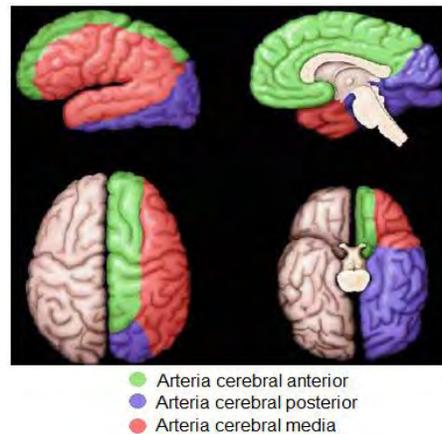


**Figura 2.** Accidentes cerebrovasculares. a) representa la obstrucción ocasionada por un émbolo en la ACM, transportado desde una arteria proximal o desde el corazón. b) ilustra la obstrucción causada por un trombo en la ACM con previas lesiones (tomado y modificado de Ardila & Ostrosky, 2012).

### 1.2.3 Vascularización cerebral

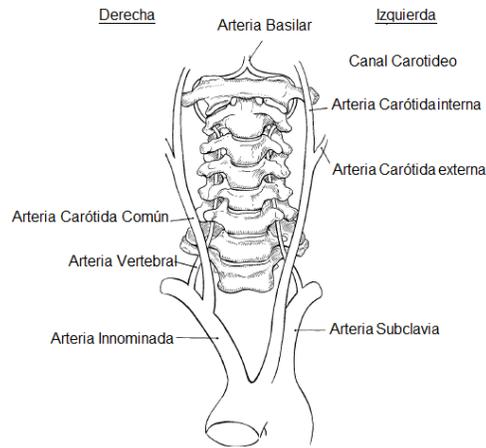
Dentro del organismo, el metabolismo, flujo sanguíneo y consumo de oxígeno están estrechamente acoplados y cambian de forma paralela. Particularmente el cerebro siendo apenas el 2% del peso total del organismo consume el 20% de oxígeno del total de éste (49 ml/ min de oxígeno). Dado su alto consumo de oxígeno es un órgano muy sensible a su déficit, y la interrupción de aporte sanguíneo produce la pérdida de conciencia en 10 segundos lo cual puede producir daños irreversibles si la interrupción se prolonga entre 8 y 10 min. Las estructuras vegetativas del SNC son más resistentes a la hipoxia (Díeguez Castrillo, 2015), en contraste con estructuras de elevado consumo de oxígeno como ganglios basales, tálamo, colículos superiores, y principalmente la región CA1 de hipocampo la cual es más sensible que otras estructuras a la hipoxia breve y por consiguiente más vulnerable a la muerte celular inducida por la falta de irrigación sanguínea (Díeguez Castrillo, 2015; Kawasaki, Traynelis, & Dingledine, 1990; Traystman, 2003).

El FSC representa el 15 % (55ml/ min/ 100g) del gasto cardiaco total en reposo (750/min; 54 ml/100 g/ min). El FSC global se refiere al flujo sanguíneo que llega a todo el cerebro, por otro lado el flujo sanguíneo local se refiere al flujo sanguíneo de una región cerebral determinada (Diéguez Castrillo, 2015; Fig.3).



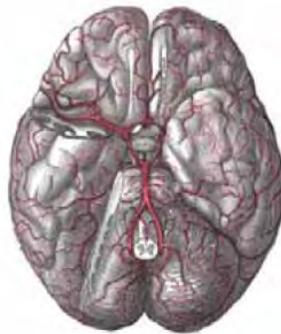
**Figura 3.** Territorios de irrigación arterial. Arteria cerebral anterior (en verde): se encarga de irrigar la cara mesial del lóbulo frontal, incluyendo el polo frontal y la parte superior del lóbulo frontal y el lóbulo parietal. Arteria cerebral posterior (en azul) irriga polo occipital, el tercio posterior medial del hemisferio cerebral y la porción temporal inferior. ACM (en rojo): irriga la parte medial de estructuras subcorticales como ganglios basales, tálamo y cápsula interna, también irriga a lóbulos, circunvoluciones superiores y media del lóbulo temporal y zonas laterales de los lóbulos parietal y occipital (Ardila et al., 2012; figura tomada y modificada de Diéguez Castrillo, 2015).

El aporte de sangre al cerebro y parte de la médula espinal, se hace a través de los sistemas carotideo interno (75% de aporte sanguíneo) y vertebro-basilar (25% del aporte sanguíneo) (Diéguez Castrillo, 2015). Las arterias carótidas irrigan la circulación anterior, incluyendo la mayoría del prosencéfalo exceptuando el lóbulo occipital y la superficie inferior del lóbulo temporal. La bifurcación de la arteria carótida común (Fig. 4) es un lugar habitual de formación de placas en la aterosclerosis, conduciendo a una oclusión gradual del flujo sanguíneo hacia el prosencéfalo por la parte ipsilateral. Por su lado el sistema vertebro-basilar irriga la región posterior del encéfalo, incluyendo la mayor parte del tronco encefálico, parte del diencefalo y los lóbulos occipital e inferior temporal del prosencéfalo (Felten & Shetty, 2010).



**Figura 4.** Dibujo esquemático del origen de los vasos sanguíneos cerebrales desde el arco aórtico. La figura ilustra la bifurcación de la arteria carótida común (tomada y modificada de Egan, 2005).

El polígono de Willis comunica a los sistemas, carotideo y vertebro-basilar y los lados derecho e izquierdo permitiendo que la sangre proveniente de las arterias carótidas internas y el tronco basilar se distribuya a ambos hemisferios (Diéguez Castrillo, 2015; Fig. 5).



**Figura 5.** Comunicación de Sistema Carotideo y Vertebro-basilar a través del polígono de Willis (tomado y modificado de Diéguez Castrillo, 2015).

#### 1.2.4 Fisiopatología de la Isquemia Cerebral Aguda

La extensión de las lesiones tisulares desencadenadas por un evento isquémico dependerá del grado de disminución del FSC regional, de la duración de la isquemia, así como de la cantidad y calidad de la circulación colateral existente,

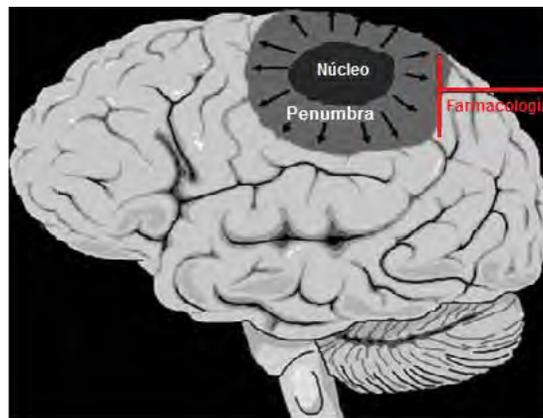
proporcionada sobre todo por el polígono de Willis. Dicho mecanismo de circulación colateral es mejor cuando la oclusión se da progresivamente en comparación de cuando sucede de forma súbita (Alcaraz Moreno, 2002).

En condiciones normales el FSC es de 55ml/100gr/minuto, lo que asegura una liberación continua de oxígeno y glucosa que sirven como sustratos para mantener los potenciales de membrana celular, así como la síntesis y liberación de neurotransmisores (Arauz, Murillo, & Bonnin, 2002). Cuando el FSC regional desciende hasta cifras inferiores a 10-15ml/100gr/min el daño neuronal puede ser irreversible (Arauz, et al., 2002), produciéndose fallos en las funciones membranales con pérdida de la homeostasia celular iónica y la muerte neuronal después de 30 minutos (Alcaraz Moreno, 2002), mientras que en las regiones que rodean a esta zona, la reducción del flujo es menor (de 15 a 35ml/100gr/min) y la evolución a irreversible es menos rápida (Arauz, et al., 2002).

Teniendo en cuenta la existencia de éstos umbrales de flujo a partir de los cuales se van perdiendo funciones celulares se puede entender que existan áreas de tejido sometidas a mayor grado de isquemia, como son aquellas que dependen estrictamente de la arteria afectada, con ausencia total o casi total de FSC, así como las zonas más susceptibles, que sufrirán de manera prácticamente inmediata la muerte de todo tipo de células, ésta zona directamente afectada se denomina núcleo de infarto (Leciñana, 2011; Fig.6). El núcleo de infarto puede volverse más extenso si la zona alrededor de este no es tratada convenientemente, dicha zona es denominada periférica o de penumbra isquémica (Alcaraz Moreno, 2002), en la cual se conserva un FSC de 15 a 35ml/100gr/min (Arauz, et al. 2002), en esta zona la función neuronal eléctrica está abolida, sin embargo, las neuronas se mantienen viables hasta que la producción de Adenosín Trifosfato (ATP) cae por debajo del 50% de los niveles normales (Arauz, et al., 2002), no obstante, la preservación del metabolismo energético la hace potencialmente reversible de la isquemia y tiene entre otras características una relación temporal con el área focal de necrosis, por lo que su conversión a isquemia es un fenómeno relativamente progresivo (Alcaraz Moreno, 2002).

El concepto de penumbra ha tenido gran impacto clínico debido a que, se asume como una zona potencialmente viable, en la que la integridad de la membrana celular se preserva y puede ser rescatada de la necrosis (Arauz, et al., 2002), por lo tanto es transitoriamente susceptible de recuperación si la hipoperfusión y las alteraciones que ésta produce se corrigen, y por tanto es la diana de las medidas terapéuticas dirigidas a reducir la lesión y las secuelas tras la isquemia cerebral. Cuando la hipoperfusión se prolonga por demasiado tiempo las alteraciones bioquímicas que resultan del trastorno de la función celular, denominadas cascada isquémica, terminarán provocando la pérdida irreversible de la viabilidad celular causando su muerte (Leciñana, 2011; León R., et al., 2015).

El periodo de tiempo durante el cual la penumbra persiste representa una ventana de oportunidad terapéutica que depende fundamentalmente de la severidad de la isquemia, del FSC proveniente de colaterales, de la vulnerabilidad selectiva del tejido neuronal afectado y de factores sistémicos, tales como la glucemia sérica, la presión arterial sistémica y la temperatura corporal (Arauz, et al., 2002).



**Figura 6.** La imagen representa el núcleo isquémico con daños irreversibles rodeado del área de penumbra, ésta última con posibilidades de recuperación, blanco farmacológico. (Tomado y modificado de Jordán, Ikuta, García, Calleja & Segura, 2007).

La isquemia cerebral es un fenómeno dinámico, complejo, y tiene lugar de manera abrupta. La lesión cerebral y alteraciones moleculares que se producen en las células (tanto neuronas como en glía y en elementos vasculares de la microcirculación en la zona afectada) después de la ICT y la ICA se desarrollan a partir de una compleja serie de eventos fisiopatológicos que evolucionan en el tiempo y el espacio (Dirnagl, et al.,1999; Leciñana, 2011), ocurren de manera secuencial dependiendo de la gravedad de la isquemia, y de que se apliquen o no medidas terapéuticas dirigidas a proteger el tejido afectado (Leciñana, 2011). Una vez que se presenta la disminución del FSC, privando al tejido cerebral de oxígeno y alimento en cuestión de minutos (Mayo Clinic, 2014), se desencadena una cascada de eventos bioquímicos que inicia con la pérdida de energía, por la falta de síntesis de ATP dando lugar a los mecanismos de glucólisis anaerobia con producción de ácido láctico y acidosis intra y extracelular (Alcaraz Moreno, 2002; Arauza et al., 2012).

Como se mencionó antes la muerte celular por isquemia es un proceso dependiente del tiempo por lo que si se logra la reperfusión antes de que transcurran de 3 a 6 horas desde el inicio del evento isquémico es posible minimizar la lesión. Sin embargo, si se retrasa más de éste periodo, suele aparecer la denominada lesión por reperfusión, que incluso puede empeorar la lesión tisular. Así, la restitución del aporte de oxígeno favorece la producción de los radicales libres, y la recirculación provoca un mayor edema vasogénico (Alcaraz Moreno, 2002).

A los 10 segundos de disminuir el FSC se produce una insuficiencia metabólica del tejido cerebral, estudios electroencefalográficos registran un enlentecimiento de la actividad eléctrica y la disfunción cerebral se hace evidente. Cuando la circulación se repara inmediatamente, se produce una recuperación brusca y completa de la función. En contraste la hipoperfusión persistente durante varios minutos da lugar a una lesión neuronal, si se restaura el flujo, la recuperación de la función tiene lugar durante varios minutos u horas, pudiendo ser incompleta. Además durante la insuficiencia circulatoria, los elementos sanguíneos pueden aglutinarse, el endotelio

capilar puede edematizarse y el flujo sanguíneo puede no llegar a reestablecerse incluso aunque la causa primaria del fallo de flujo se corrija. Periodos más prolongados de isquemia producen necrosis tisular. En esta situación aparece edema cerebral, que progresa a lo largo de los 2 a 4 días siguientes (Alcaraz Moreno, 2002).

En el núcleo de infarto, los primeros eventos después de la disminución del FSC son la inhibición en la síntesis de proteínas, depresión de las reservas de energía intracelular, despolarización de la membrana celular, y liberación de potasio ( $K^+$ ) intracelular, seguido de entrada de calcio ( $Ca^{2+}$ ) a la célula, liberación de neurotransmisores, y compromiso metabólico celular, lo cual conduce a la peroxidación lipídica debido a la captura de electrones de los lípidos en las membranas celulares por parte de los radicales libres, dando como resultado final la destrucción nuclear y la muerte neuronal (Arauz, et al., 2002).

A nivel molecular la disminución del FSC se expresa con el aumento en la extracción de oxígeno, mayor demanda de glucosa, y acidosis láctica. Durante la isquemia cerebral, las fuentes de almacenamiento del ATP se ven rápidamente reducidas, lo que produce una despolarización permanente de la membrana celular por apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, y pérdida del gradiente iónico. Inmediatamente después se presenta una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  al espacio intracelular, acidosis y disfunción en los neurotransmisores. Existe además, liberación presináptica excesiva de glutamato, que estimula a los receptores post sinápticos, especialmente al receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) que en conjunto con el glutamato, perpetúan la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula. Otras alteraciones del flujo iónico se producen por interacción del glutamato con sus receptores metabotrópicos y  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-ácido propiónico (AMPA) (Arauz, et al., 2002). Entre los mecanismos patógenos más importantes en la cascada de muerte neuronal que se desemboca se incluyen la lesión mitocondrial, inflamación (Dirnagl, et al., 1999) y la formación de radicales libres (Arauz, et al., 2012) a causa de la liberación excesiva de glutamato, responsable en gran parte de

los fenómenos de excitotoxicidad, con síntesis y liberación de radicales libres en el tejido cerebral isquémico (Torregosa, Salom, Jover Mengual, & Alborch, 2007).

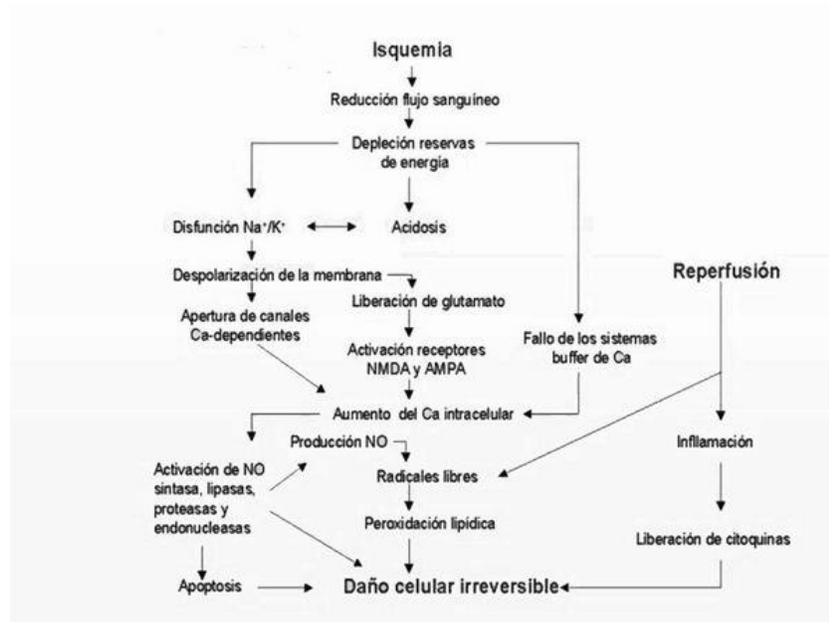
El glutamato actúa, por un lado, sobre sus receptores principalmente del tipo AMPA y NMDA, en éstos últimos desplazando el magnesio que, en situación de reposo, actúa bloqueando el paso de otros iones; de este modo se abre una nueva vía que permite el paso de iones calcio al interior de la célula. El glutamato también induce la formación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Radicales libres como NO y ROS tienen, en condiciones normales, funciones fisiológicas; de hecho a nivel cerebral el NO actúa como segundo mensajero y provoca vasodilatación arteriolar cuando actúa sobre los vasos sanguíneos (Castellanos, Sobrino, & Castillo, 2006).

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina gracias a la acción de la enzima NOS, de la cual se conocen tres isoformas, neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) la sobreactivación de éstas isoformas ocasiona la sobreproducción de NO, el cual tiene una vida media muy corta y, en condiciones normales, las pequeñas cantidades producidas son metabolizadas por mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y mecanismos no enzimáticos como las vitaminas C, E y la glutatión; de modo que existe un equilibrio entre los radicales que se producen y los que son eliminados.

Durante la isquemia cerebral se producen concentraciones anormalmente elevadas de sustancias oxidantes (Leciñana, 2011), entre las que se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ), el NO y el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ); todas ellas implicadas en el daño neuronal que ocurre durante la isquemia; el  $O_2^-$  se considera el agente oxidante más importante, pues causa daño cerebral directamente y por reactividad con el NO, al generarse  $ONOO^-$  (Torregosa, et al., 2007; Fig. 7).

Entre los efectos nocivos de los radicales libres liberados en el tejido cerebral isquémico se encuentran, la generación del  $ONOO^-$ , que es muy tóxico por su alta capacidad oxidante, produciendo entre otros efectos peroxidación lipídica, nitración

de grupos tirosina, oxidación y nitrosilación de grupos sulfidrilo y rotura del ADN, también se produce la inhibición de enzimas antioxidantes causada por el NO como la glutatión peroxidasa y a la citocromo c oxidasa que se encuentra a nivel mitocondrial, alterando la cadena respiratoria. La inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial hace que se reduzca la producción de ATP (Hurtado, Moro, & Sobrado, 2007).



**Figura 7.** El esquema ilustra la temporalidad de los eventos resultantes de la hipoperfusión sanguínea. Tomada y modificada de Hernández Aguilar, 2013.

La actividad de las isoformas nNOS y eNOS de la NOS, está regulada por el calcio (Leciñana, 2011). Su activación durante la isquemia cerebral ocurre principalmente en las fases iniciales. La iNOS, por su parte, se ha identificado en diferentes tipos celulares del sistema nervioso como astrogliá, microgliá, neuronas, células del músculo liso y endotelio vascular y también en los neutrófilos infiltrados en el tejido cerebral isquémico. Esta isoforma es inducida por mediadores inflamatorios y es independiente del calcio, produce de forma retardada incrementos significativos en la concentración de NO en el área isquémica que contribuyen de forma importante a la progresión del daño cerebral induciendo la fusión de vesículas sinápticas a la membrana, con liberación de neurotransmisores como el glutamato

a la hendidura sináptica, contribuyendo aún más al daño por excitotoxicidad (Torregosa, et al., 2007). Se ha demostrado que la inhibición de la nNOS reduce el tamaño del infarto en modelos experimentales de isquemia cerebral (Castellanos et al., 2006).

De acuerdo a la evidencia los procesos inflamatorios desatados en la isquemia contribuyen a la progresión del daño cerebral, al menos en su fase aguda (Torregosa et al., 2007). Éstos mecanismos inflamatorios han sido asociados con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular tras un primer ictus isquémico (del Zoppo, 2006). El SNC cuenta con células inflamatorias innatas como la microglía y los macrófagos, que poseen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias. Dichos procesos inflamatorios que tienen lugar después de un infarto cerebral se caracterizan por dos procesos, la infiltración de leucocitos, especialmente neutrófilos, en el parénquima cerebral (Cuenca López, y otros, 2010) y la activación de la microglía, ambos procesos surgen como respuesta a la lesión y pueden contribuir al daño cerebral observado después de la isquemia (Torregosa et al., 2007).

### **1.2.5 Activación microglial.**

Generalmente la microglía se encuentra en una fase de reposo y constituye entre un 5% y 20% de la población glial (Deb, Sharma, & Hassan, 2010), forma una red diseminada en el SNC capaz de detectar y reaccionar ante las modificaciones del ambiente (Cuenca López, et al., 2010). Durante la isquemia, dependiendo del tiempo y la extensión, se activan, y someten a una transformación morfológica y metabólica importante (Deb. Et al., 2010). Tras la activación de la microglía puede aumentar la expresión de mediadores inflamatorios como las citocinas, quimiocinas y prostaglandinas, que sobre regulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, facilitando la invasión de células inflamatorias circulantes y la posterior liberación de moléculas tóxicas para las neuronas; por lo tanto, en la isquemia cerebral aumenta la permeabilidad de la

barrera hematoencefálica y las células inflamatorias entran en contacto con los antígenos del SNC tanto en el cerebro como en la periferia (Cuenca et al., 2010).

En el cerebro maduro, la microglía se encuentra en reposo y posee una morfología ramificada capaz de monitorizar el ambiente cerebral (Cuenca López, et al., 2010). Las células microgliales son los macrófagos residentes en el cerebro y desempeñan importantes funciones como células inmunocompetentes y fagocíticas, además actúan como secuestradores de radicales libres durante la isquemia. Sin embargo, tras la isquemia, durante su etapa reactiva éstas células se transforman en fagocitos (Torregosa et al., 2007) y su excesiva activación puede destruir tanto neuronas sanas como dañadas (Hong, Yun Kim, Iizuka, Eun Lee, & Seong, 2011).

Normalmente los cambios neuroinflamatorios de la microglía son transitorios y se presentan únicamente ante el estímulo inmune, sin embargo, los procesos asociados al envejecimiento o a una enfermedad neurológica pueden provocar un ambiente donde la microglía sea más reactiva a un estímulo inmune periférico. Así en respuesta a ciertos procesos como la isquemia cerebral la microglía se activa rápidamente y secreta una gama de factores, algunos implicados en la apoptosis y la liberación de mediadores inflamatorios pocos minutos después del evento isquémico exacerbando el daño tisular, como la enzima elastasa, factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento transformante beta y radicales libres oxidativos, por otro lado también se ha visto implicada en la liberación de factores tróficos y antiinflamatorios como las interleucinas 5,6 y 10 (Arango Davila, Escobar Betancourt, Cardona Gómez, & Pimienta Jiménez, 2004; Cuenca et al., 2010; Romano, 2011). Más tardíamente la microglía puede fomentar la supervivencia de las células y la reparación de los tejidos por la síntesis de factores de crecimiento como las interleucinas 1 y 3, y los factores de transformación y crecimiento celular, que estimulan la astrogliosis y la supervivencia neuronal (Arango Davila et al., 2004).

Las características morfológicas de la microglía varían de acuerdo a su estado funcional. En el caso de la isquemia, depende del grado de afectación del tejido. Presentándose así tres tipos morfológicos:

- Microglía ramificada o microglía de reposo.
- Microglía activa (se observa en sitios donde la afectación isquémica es subletal se activa en el lapso de la primera hora de la lesión isquémica)
- Microglía reactiva (se observan en la lesión isquémica en el lapso de las primeras seis horas y aumentan su número de forma importante hasta las 24 horas) (Arango Davila et al., 2004; Bronstein, Torres, Nissen, & Tsirka, 2013).

En algunos estudios se ha observado que pacientes con infarto cerebral agudo muestran una evolución más favorable mediante el tratamiento con fármacos inhibidores de la activación de la microglía, como la minociclina, la cual es un derivado de las tetraciclinas que presenta acciones antiinflamatorias, lo cual probablemente funciona como un citoprotector del SNC (Cuenca López, et al., 2010).

Farmacológicamente la cascada de eventos fisiopatológicos tras la isquemia puede ser modificada y disminuir sus efectos deletéreos, lo que representa en la actualidad una de las áreas de investigación más activa (Arauz et al., 2012). El blanco de intervención terapéutica después del accidente cerebrovascular es la ya mencionada zona de penumbra, dadas las características del tejido en esta zona se convierte en un objetivo potencialmente recuperable (Castellanos et al., 2006).

### **1.2.6** Signos, síntomas y cuadros clínicos de la Isquemia Cerebral Aguda

Un EVC es una emergencia médica. Cada minuto cuenta cuando alguien está sufriendo un EVC. Cuanto más tiempo dure la interrupción del flujo sanguíneo hacia el cerebro, mayor es el daño. La atención inmediata puede salvar la vida de la persona y aumentar sus posibilidades de una recuperación exitosa (Reséndiz, 2010).

Antes de presentarse un episodio de ICA en general se presentan signos de alarma identificados y clasificados por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” de la siguiente forma:

- Entumecimiento, debilidad o parálisis de la cara, el brazo o la pierna, en uno o ambos lados del cuerpo y que aparece en forma repentina.
- Ocurrencia súbita de visión borrosa o reducción de la visión en uno o ambos ojos.
- Aparición brusca de mareos, pérdida del equilibrio o caídas sin explicaciones.
- Incapacidad repentina para comunicarse ya sea por dificultad para hablar o entender.
- Aparición súbita de dolor de cabeza, de gran intensidad y sin causa conocida.

Regularmente la sintomatología de los EVC en el hemisferio izquierdo es más evidente dada la afección del lenguaje. Hay multiplicidad de defectos en el conocimiento espacial, en el conocimiento de sí mismo, en la realización de tareas constructivas, etc., que se relacionan con daño en el hemisferio derecho y que pueden pasar completamente inadvertidos (Ardila et al., 2012).

Estos signos de alarma pueden durar sólo unos cuantos minutos al tratarse de un evento transitorio y luego desaparecer, sin embargo en la ICA las consecuencias son mayores y requieren de atención médica inmediata. Los efectos de un EVC pueden variar desde leves hasta severos, y pueden incluir parálisis, problemas de raciocinio, del habla, problemas de visión, y problemas en la coordinación motora (Reséndiz, 2010).

La realización de una evaluación correcta de los síntomas y signos neuropsicológicos es de gran importancia, la exploración adecuada permite precisar la región vascular afectada, la extensión y severidad del accidente en cuestión (Ardila et al., 2012). Los síntomas presentados por cada paciente dependerán del territorio arterial afectado, debido a que los cuadros clínicos resultantes de la afectación de los grandes vasos son característicos para cada uno (Díez Tejedor et al., 2001; Tabla 1).

**Tabla 1.** Descripción de signos y síntomas característicos de cada territorio arterial (Basada en Díez Tejedor et al., 2001).

Territorio Arterial	Signos y Síntomas
<b>Arteria Carótida Interna</b>	El cuadro neurológico puede variar desde la monoparesia a la hemiparesia con o sin defecto homónimo en la visión, deterioro del habla o lenguaje, diversas variedades de agnosia y defectos sensitivos desde parcial hasta total.
<b>Arteria Cerebral Media</b>	Su afectación origina un déficit grave que incluye hemiplejía, hemihipoestesia, hemianopsia homónima, paresia de la mirada contralateral y, si el infarto es en el hemisferio dominante, afasia. La oclusión del tronco de la arteria cerebral media puede originar primariamente un déficit motor .
<b>Arteria Cerebral Anterior</b>	La obstrucción distal se asocia con debilidad del miembro inferior opuesto, y debilidad de los músculos proximales de la extremidad superior. La afectación sensitiva de la misma área puede acompañar a la paresia. También pueden aparecer apraxia, de la marcha, apatía, desviación oculocefálica, trastornos del comportamiento, paratonía contralateral, reflejos de liberación frontal e incontinencia urinaria .
<b>Sistema Vertebrobasilar</b>	<b>Arteria Vertebral:</b> . La oclusión de una arteria vertebral o de la arteria cerebelosa inferior puede producir infarto bulbar lateral, caracterizado por súbito vértigo grave, náuseas, vómitos, disfagia, ataxia cerebelosa ipsilateral, síndrome de Horner ipsilateral, y déficit de la discriminación de dolor y temperatura en la hemicara ipsilateral y el hemicuerpo contralateral .
	<b>Arteria Basilar:</b> La oclusión o estenosis de la arteria basilar genera signos de deterioro tronco-encefálico bilateral, mientras que los síndromes debidos a la estenosis u oclusión de una rama afectan a estructuras sólo de un lado del tronco del encéfalo. La afectación de estas ramas pueden afectar motora o sensitivamente un lado de la cara y el hemicuerpo contralateral. El vértigo y nistagmo pueden ser síntomas prominentes.
	<b>Arteria Cerebral Posterior:</b> La mayoría de las oclusiones produce un defecto visual homolateral, generalmente hemianópsico o cuadrantonópsico. Otros trastornos visuales, más complejos, que puede producir son: palinopsia, polioptía, metamorfopsia, visión telescópica, prosopagnosia, etc. Hay problemas adicionales como la dislexia y la discalculia, que ocurren debido a la afectación del hemisferio dominante. La afectación del hemisferio no dominante puede producir un síndrome parietal. En el infarto talámico puede ocurrir un déficit hemisensorial y, ocasionalmente, llevar a un síndrome talámico. Cuando ambas arterias cerebrales posteriores están ocluidas, se produce la ceguera cortical y frecuentemente alteraciones del comportamiento.

### 1.3 Modelos animales de investigación para Isquemia Cerebral

Gran parte del conocimiento actual sobre la patología cerebrovascular se debe a los estudios experimentales que han contribuido al mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad. Además, en el estudio de la isquemia cerebral humana, ha sido y es especialmente relevante la necesidad de recurrir a los modelos experimentales debido al carácter agudo de la enfermedad, a la rapidez con la que se produce el daño cerebral y, obviamente, por la limitada accesibilidad al cerebro humano. Los modelos experimentales de la isquemia cerebral permiten estudiar y conocer mejor la patogénesis de la enfermedad y determinar los mecanismos celulares y moleculares que se hallan implicados (Rosell, 2007). Por lo anterior, la selección de un modelo experimental es fundamental para la interpretación correcta de los resultados obtenidos en cuanto a pruebas farmacológicas en busca de un neuroprotector (Agulla, Argibay, Pérez Mato, Brea, Ramos Cabrer & Castillo, 2011).

Los modelos animales tienen como propósito evitar que la glucosa llegue al cerebro y que el oxígeno acceda al tejido cerebral dado que lo que se intenta es reproducir el daño cerebral que acontece después del ictus. A pesar de las diferencias entre especies, el parecido anatómico y fisiológico entre el cerebro humano y el de algunos vertebrados superiores hace que en estos últimos se hayan desarrollado multitud de modelos *in vivo* de isquemia cerebral. Concretamente, han sido los modelos en roedores, los más utilizados, por el menor coste, manejo y aceptación ética. Dichos modelos pueden agruparse en dos categorías: modelos *in vitro* a nivel celular o tisular, los cuales permiten efectuar un estudio a nivel más celular y molecular; y los modelos *in vivo* que se llevan a cabo con animales y permiten, bajo condiciones muy controladas, reproducir la patología humana además de un estudio más general de la isquemia cerebral (Rosell, 2007). Dentro de los modelos *in vivo* se ha logrado caracterizar la evolución de la isquemia cerebral en modelos de isquemia cerebral focal y global (Agulla et al., 2011).

Los modelos de isquemia focal se inducen por la oclusión permanente o transitoria de una arteria cerebral específica que suele ser la ACM (Rosell, 2007),

ejemplo de ello son los modelos de Sutura intracraneal de la ACM, electrocoagulación de la ACM, y la oclusión intraluminal de la ACM (Agulla et al., 2011; Traystman, 2003). Existen también modelos de microembolismo los cuales reproducen los focos de infarto producidos por microémbolos (Koizumi, Yoshida, Nazakawa, & Ooneda , 1986), entre otros.

Es importante considerar que los modelos animales utilizados para las pruebas preclínicas no reflejan con fidelidad lo que ocurre en los humanos, esta es una limitación que se debe tener en cuenta y por lo cual existen diferentes modelos animales de isquemia cerebral (Rosell, 2007).

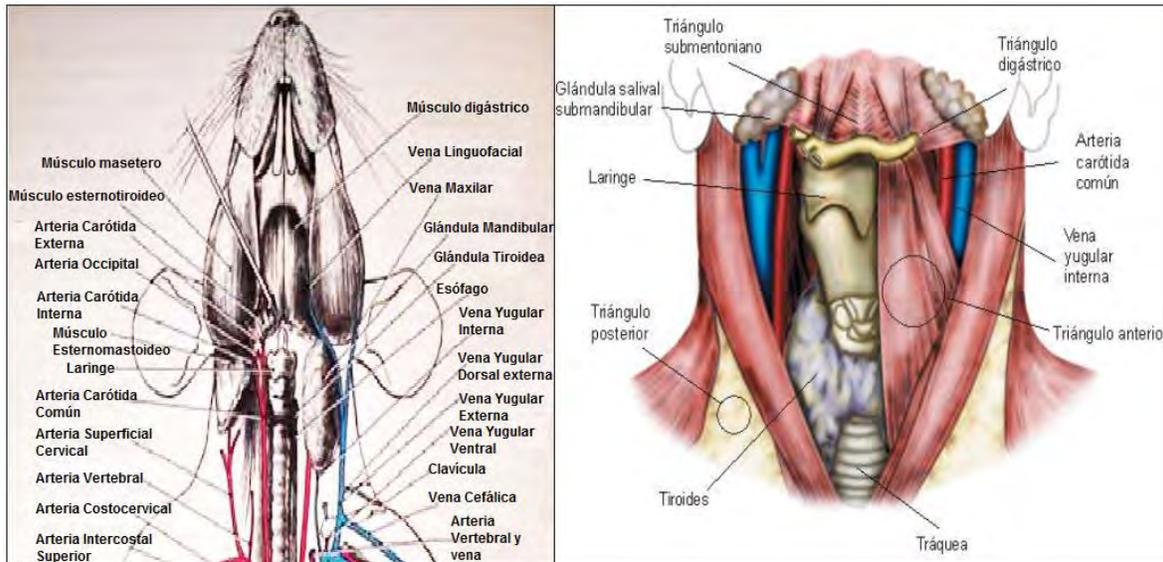
### **1.3.1 Modelo de Isquemia Cerebral de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes (SSACC)**

En la actualidad se busca generar modelos de Isquemia que puedan trasladarse a la clínica, entre los cuales cabe resaltar los modelos de isquemia global en animales, tal es el caso del modelo de SSACC, dicho modelo de ICA busca ajustarse a las condiciones clínicas (Rodríguez et al., 2000).

El modelo SSACC consiste en dos cirugías, en la primera se liga la arteria carótida común izquierda para su posterior seccionamiento; la segunda cirugía se realiza 32 días después de la primera y de la misma forma se liga la arteria carótida común derecha para su posterior seccionamiento. Luego de las dos cirugías el sujeto conservará solamente la irrigación del sistema basilar. La ligadura permanente de ambas arterias carótidas comunes reduce significativamente el FSC lo cual de acuerdo a lo descrito anteriormente induce diferentes grados de déficits conductuales y neurológicos acompañados de gliosis de la sustancia blanca y la pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo (Rodríguez et al., 2000).

El empleo de roedores en los experimentos de isquemia cerebral ha sido una constante al facilitar, por un lado el mantenimiento y cuidado de los animales en los bioterios y por el otro por las similitudes anatómicas que existen con los humanos. En lo que respecta al sistema circulatorio la posición de las arterias cerebrales y

carótidas es muy similar entre los roedores y el ser humano (Hernández Aguilar, 2013; Fig.8).



**Figura 8.** Comparación de Sistema Carotideo de humanos y ratones (Tomada y modificada de Hernández Aguilar, 2013).

### 1.3.2 Consecuencias Neuroconductuales inducidas por el modelo de isquemia cerebral SSACC en ratones.

Se han observado diferentes secuelas neuroconductuales resultado de la ICA inducida con el modelo SSACC. Entre estas secuelas se encuentran: hipomobilidad (movilidad espontanea disminuida), postura lateralizada (posición anormal del cuerpo caracterizada por una tendencia persistente a apoyarse sobre un lado del cuerpo), postura aplanada (posición anormal del cuerpo caracterizada por movimientos lentos y arrastrar el cuerpo a lo largo de la mesa de observación), espalda encorvada (presencia persistente de una postura agachada), piloerección, marcha atáxica (tendencia a balancearse, mecerse, o tambalearse a un lado mientras el animal camina hacia adelante), rodear (espontanea o forzadamente (empujándolo amablemente con un dedo) caminando consistentemente a un lado), temblores, sacudimiento (abrupta sacudida del cuerpo), convulsiones (sacudimientos repetitivos seguidos de la extensión de las extremidades traseras), respiración cansada, flexión de extremidades anteriores, decremento de la fuerza

muscular, incoordinación motora y muerte (Rodríguez, Santiago Mejía, Gómez, & Ramírez San Juan, 2005).

La caracterización de estos déficits neuroconductuales causados por la hipoperfusión inducida por el modelo SSACC, y la sobrevida ayudan a dilucidar el grado de déficit y además de permitir una evaluación cuantitativa de la eficacia neuroprotectora de los fármacos que se prueben con dicho modelo, y del impacto de la isquemia inducida (Rodríguez, et al., 2000).

La importancia de evaluar con precisión el estado neurológico de los animales isquémicos en los estudios sobre la eficacia de un tratamiento dado es obvia. La estimación de la capacidad funcional en los animales por medio de evaluaciones neurológicas cuantitativas proporciona una medida fiable para determinar el curso y las consecuencias de las manipulaciones farmacológicas. De esta necesidad y tras la caracterización de los déficits neurológicos provocados por el modelo SSACC surge la Escala de Discapacidad Neurológica (NDSS, por sus siglas en inglés) para ratones, la cual consiste en una evaluación neurológica centrada en gran medida en la función motora, pero también incluye la medición de otras funciones cerebrales. La escala NDSS delinea seis grandes pasos progresivos o grados de disfunción global atribuible a la isquemia cerebral. Esta escala es en una base de 0 a 10, éstos valores representan la suma de las deficiencias neurológicas, arrojando una puntuación equivalente al daño funcional del cerebro, independientemente de las estructuras implicadas (Rodríguez, Santiago Mejía, Fuentes Vargas, & Ramírez San Juan, 2003).

#### **1.4 Fármacos Neuroprotectores**

En los últimos años se han estudiado diversos fármacos con posibles efectos, pues se considera que la neuroprotección aumenta la tolerancia del cerebro a la isquemia (Leciñana, 2011; Arauz, et al., 2002; Castellanos, et al., 2006; Arango, et al., 2004); gran parte de los fármacos estudiados actúan en diferentes vías de

activación como: bloqueadores de los canales de sodio, inhibición del influjo de calcio, inhibición de calpains, inhibición de la glicina en el receptor NMDA, antagonistas no competitivos de los receptores NMDA, antagonistas competitivos del receptor NMDA, antagonistas del receptor AMPA, inhibición de la síntesis de proteínas, bloqueadores de síntesis de proteínas apoptóticas (caspasas), activación de receptores metabotrópicos, neuroprotección profiláctica, atrapadores de radicales libres, y agonistas de los receptores GABA. (Pedraza, 2002; Arauz, et al., 2002; Röther, 2008) y fármacos con roles antiinflamatorios ya que estos han sido asociados con una reducción significativa del daño isquémico (Deb, et al., 2010, Röther, 2008). La lista de medicamentos a prueba en fase II y III de los ensayos es larga. Una de las primeras sustancias que mostraron un efecto neuroprotector en la isquemia experimental fue el NMDA antagonista MK-801,1 que protegía a las neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA2 de hipocampo (Röther, 2008). Dentro de estos fármacos los antagonistas de los canales del  $Ca^{2+}$  son los que se han estudiado con más profundidad (Arauz, et al., 2002).

La nimodipina, una dihidropiridina, con efecto predominante sobre el sistema nervioso, ha demostrado ser de utilidad en la prevención de vasoespasmos cerebrales secundarios a hemorragia subaracnoidea. En ICA, uno de los estudios iniciales fue el estudio INWEST (The Intravenous Nimodipine West European Stroke Trial) en el que se demostró que administrada por vía intravenosa, la nimodipina disminuye significativamente la presión arterial media, la presión arterial diastólica y por lo tanto la presión de perfusión cerebral, lo que se traduce por una mayor morbimortalidad, dependiente de la dosis; es decir a mayor dosis; mayor morbimortalidad, por lo que su administración parenteral no está indicada en pacientes con infarto cerebral agudo (Arauz, et al., 2002).

Muchos estudios preclínicos han demostrado efectos neuroprotectores de diversos agentes farmacológicos en una variedad de modelos isquémicos y de especies. Sin embargo, cuando estos agentes farmacológicos se han llevado a ensayos en humanos, han sido infructuosos (Traystman, 2003).

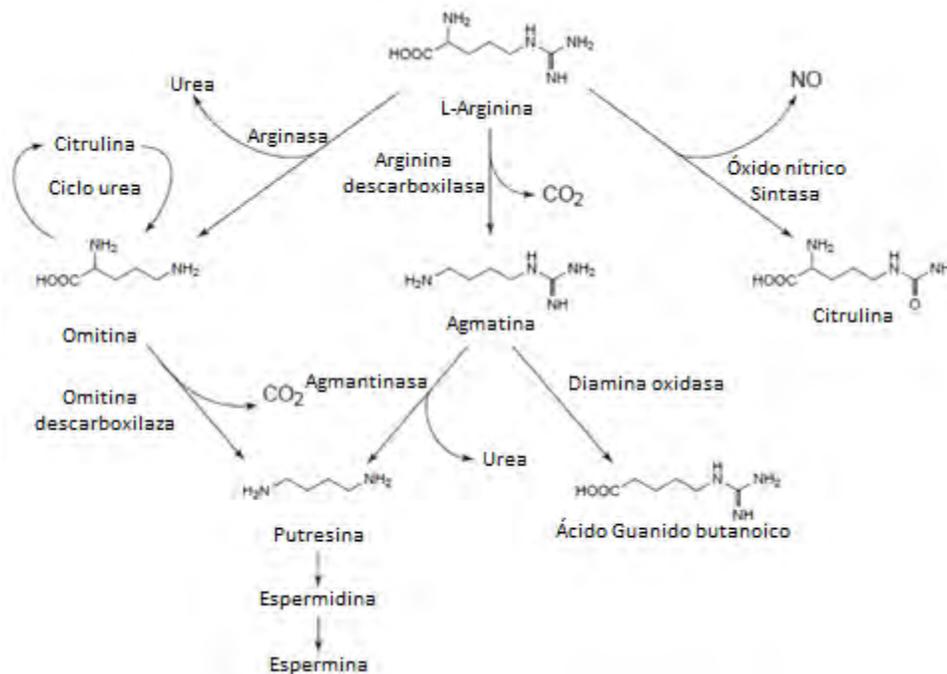
El único medicamento de aplicación clínica que existe hoy en día es el Activador de Plasminógeno Tisular Recombinante el cual ayuda al restablecimiento del flujo sanguíneo al utilizarse durante una trombosis ya que es una proteína proteolítica implicada en la disolución de coágulos de sangre (Muñoz Collazos, Gutiérrez, Londoño, Bayona, Herrán & Pérez, 2008).

El tratamiento eficaz de accidente cerebrovascular isquémico es probablemente el resultado de una combinación de modalidades terapéuticas dirigidas a diferentes mecanismos de daño cerebral isquémico y suministrados en momentos específicos después de la ICA (Janardhan & Qureshi, 2004; Arango, et al., 2004).

#### **1.4.1 Agmatina: ¿una nueva opción farmacológica?**

La agmatina es una amina biógena sintetizada por la descarboxilación de la L-arginina mediante la arginina descarboxilasa, una enzima producida por mamíferos y que es parte de la membrana mitocondrial celular, existe en plantas y bacterias, y es un intermediario en la biosíntesis de poliaminas. En el cerebro es sintetizada como una putrescina por la actividad de la agmatinasa (Molderings & Haenisch, 2012; Halaris & Plietz, 2007 Fig, 9). La agmatina se empaqueta en sinaptosomas con glutamato y vasopresina y en vesículas sinápticas, distribuyéndose en neuronas del hipotálamo, el hipocampo, y la médula espinal, además, ha sido localizada inmunocitoquímicamente en el soma neuronal, dendritas y axones terminales. Es altamente dependiente de la despolarización por calcio y CO<sub>2</sub>, y tras su liberación se induce una despolarización de los receptores transmembranales (Halaris, et al., 2007; Reis & Regunathan, 2000). Existe evidencia de que la Agmatina puede desempeñar un importante papel como un neuromodulador o un neurotransmisor debido a que cumple la mayoría de los criterios para ser considerada un neurotransmisor central (Reis, et al., 2000; Navarro, 2002). En el cerebro de ratas se encontró que su concentración en el cerebro es comparable a la de los neurotransmisores clásicos, las mayores concentraciones pueden hallarse en las capas más profundas de la neocorteza, el

hipocampo, la amígdala, el septum, el núcleo de la estría terminal, los núcleos talámicos de la línea media y el hipotálamo (Navarro, 2002).



**Figura 9.** Vías metabólicas de la Agmatina y compuestos relacionados. La Agmatina se produce a partir de L-arginina por la acción de la Arginina Descarboxilasa (tomado y modificado de Reis, et al., 2000).

Se han propuesto diversos efectos de la Agmatina incluyendo su acción como anticonvulsiva, analgésica, anti-estresante, antineurotóxica y antidepresiva. Inicialmente fue descrita como la clonidina debido a su alta al receptor  $\alpha$ -2-adrenérgico, desplazando sustancias naturales, actuando como un ligando endógeno para el receptor de imidazolina (Halaris, et al., 2007; Reis, et al., 2000; Uzbay, 2012; Navarro, 2002). Una teoría de la existencia de la Agmatina es que ésta juega un rol neuroprotector, esta teoría se basa en el hecho de que la Agmatina inhibe la NOS antagonizando el receptor NMDA e inhibiendo la actividad de la enzima responsable de la síntesis del NO, por otro lado, como resultado de su capacidad para inhibir la hiperalgesia y promover la tolerancia a la retirada de la morfina, la Agmatina tiene potencial como un tratamiento del dolor crónico, estados adictivos y de lesión cerebral (Reis & Regunathan, 2000); respecto a este efecto, se

ha descrito que la presencia de Agmatina atenúa la muerte neuronal inducida por NO de origen microglial, debido a que la agmatina inhibe la producción de NO en dichas células (Abe, Abe, & Saito, 2000; Ahn et al., 2012).

Diversos estudios han demostrado que la Agmatina también ejerce efectos neuroprotectores en diferentes modelos de daño cerebral *in vitro* e *in vivo*, reduciendo el tamaño de los infartos isquémicos o la pérdida de neuronas hipocampales (Navarro, 2002). Una de las hipótesis existentes acerca de su papel neuroprotector se basa en el efecto que ejerce la Agmatina en presencia del daño hipóxico (Hong, Yun Kim, Iizuka, Eun Lee, & Seong, 2011; Hong, Park, Kim, & Seong, 2008), ya que, provoca una disminución de la liberación del TNF-  $\alpha$ , hasta después de 12 horas de exposición a la hipoxia (Hong, et al., 2008).

La Agmatina posee características remarcables, ya que al ser un catión orgánico puede penetrar en la célula a través de canales iónicos; su función en el cerebro aún no ha sido determinada, podría ser un anti-inflamatorio debido a la inhibición que ejerce ante altos niveles de NO (evento importante en la isquemia cerebral) (Uzbay, 2012; Navarro, 2002; Abe, et al., 2000), estudios de dependencia a morfina han demostrado que la administración de Agmatina modifica la actividad enzimática de nNOS disminuyéndola hasta un 30% y aumentando en un 26% su expresión génica (Martínez M. P., Uribe E. A., Toledo J. R., González M., Montero E., Conteras E. & Sepúlveda M. J., 2012). La producción endógena de la Agmatina se induce en respuesta al estrés y a la inflamación, éstos eventos de estrés incluyen la hipoxia causada por Isquemia (Halaris, et al., 2007).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

### **2.1 Justificación.**

Siendo la tercera causa de muerte en países industrializados las EVC exigen especial atención para su total comprensión, y para la estructuración de un tratamiento eficaz. Dado lo anterior se ha llevado a cabo la búsqueda de un fármaco neuroprotector capaz de reducir el daño neuronal tras un EVC y por lo consiguiente la conservación de capacidades cognitivas. Se han probado diversidad de fármacos con diferentes vías de acción (fármacos que favorecen a la reperfusión, atrapadores de radicales libres y antagonistas de calcio y glutamato, etc.) (Traystman, 2003), entre los que destaca el activador del plasminógeno tisular con el cual se ha reportado una evolución favorable (Dávalos, Álvarez Sabín, Martí Vilalta, & Castillo, 2003). Sin embargo, no se ha encontrado un fármaco capaz de frenar el daño ante una fase aguda en el ámbito clínico (Traystman, 2003). El presente estudio tiene como objetivo dilucidar si la agmatina es una opción farmacológica capaz de aumentar la sobrevida y de disminuir el déficit neurológico después del evento isquémico agudo.

Para lo anterior, se utilizó la evaluación NDSS de déficits característicos que reflejan la severidad del daño neurológico derivado de la Isquemia inducida con el modelo SSACC. Dicha evaluación considera los daños específicos provocados por el modelo SSACC. Esta evaluación es equiparable a una serie de baterías clínicas que cubren algunos aspectos como la coordinación motora, la simetría del movimiento, características de la marcha y tono muscular, etc.

El ya mencionado modelo SSACC que se propone emplear diluye algunas limitaciones que presentan otros modelos de Isquemia en ratones, puesto que se usan ratones envejecidos los cuales simulan de mejor manera la edad de mayor incidencia de un EVC en humanos. Con la edad de los ratones se consideran las deficiencias propias de la edad de un adulto, y a su vez las posibilidades de recuperación correspondientes a la edad en la que hay una mayor incidencia de EVC. El nivel en el que son ligadas y cortadas las arterias carótidas comunes se

ajusta a un evento de alta incidencia médica en el cual, el bloqueo responsable del evento isquémico se suscita en la bifurcación de las arterias carótidas comunes debido a que es en este lugar en donde es habitual la formación de placas en la aterosclerosis, conduciendo a una oclusión gradual del flujo.

Por otro lado con el propósito de evaluar el daño neuronal y correlacionarlo con las evaluaciones neuroconductuales, se decidió emplear un método de impregnación argéntica para microglía, dichas células están presentes durante eventos de compromiso neuronal, incluidas la inflamación y estrés neuronal características de la isquemia cerebral. La identificación de la concentración de dichas células indicativas de daño se incluyó para determinar la extensión y gravedad del daño ocasionado por el modelo SSACC, específicamente en el área CA1 de hipocampo por ser una de las estructuras más sensibles a hipoxia (Kawasaki, et al., 1990).

Se considera que es importante llevar a cabo más investigaciones con posibles fármacos neuroprotectores como lo es la Agmatina que, por sus cualidades ya descritas, podría tener éxito si se administra en la ventana temporal de tratamiento en pacientes con una fase aguda de Isquemia Cerebral.

## **2.2 Objetivo**

Determinar el efecto neuroprotector de la Agmatina exógena en las alteraciones neuroconductuales inducidas por el SSACC en ratones, y sus efectos en la sobrevida y concentración microglial en el área CA1 de hipocampo.

### **2.2.1 Objetivos específicos.**

1. Identificar el efecto neuroprotector de la Agmatina exógena con base en el porcentaje de sobrevida del grupo al cual se le someterá al procedimiento de SSACC y al tratamiento farmacológico con Agmatina (100mg/kg).

2. Identificar el efecto de la Agmatina exógena (100mg/kg) en la modificación de los déficits neurológicos causados por el modelo SSACC.
3. Identificar con doble impregnación metálica de Pio Del Rio Hortega la concentración microglial y correlacionarla con la gravedad de la lesión inducida por el SSACC en CA1 de hipocampo en los grupos con isquemia que serán sometidos a la aplicación de Agmatina Exógena.
4. Evaluar el uso de la Agmatina exógena como una alternativa farmacológica terapéutica con efecto neuroprotector.

## **2.3 Hipótesis**

La administración de agmatina tiene un efecto neuroprotector disminuyendo los déficits neuroconductuales y la concentración microglial en CA1, ocasionados por la isquemia cerebral aguda inducida por el Seccionamiento Secuencial de las Arterias Carótidas Comunes en ratones.

### **2.3.1 Hipótesis de trabajo.**

1. La aplicación de Agmatina (100mg/kg) dentro de la ventana temporal de tratamiento incrementa las curvas de supervivencia del grupo al cual se le someterá al procedimiento de Seccionamiento de Arterias Carótidas Comunes después de la segunda cirugía.
2. La aplicación de Agmatina (100mg/kg) reduce el grado de déficits neuroconductuales característicos del modelo SSACC.
3. La aplicación de Agmatina (100mg/kg) reduce la actividad microglial y por tanto la gravedad de la lesión en CA1 de hipocampo evidenciada con doble impregnación argéntica de Del Rio Hortega, causada por el SSACC.

4. La Aplicación de la Agmatina (100mg/kg) dentro de la ventana temporal de tratamiento es una alternativa farmacológica neuroprotectora para el tratamiento de la Isquemia Cerebral Aguda.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Animales**

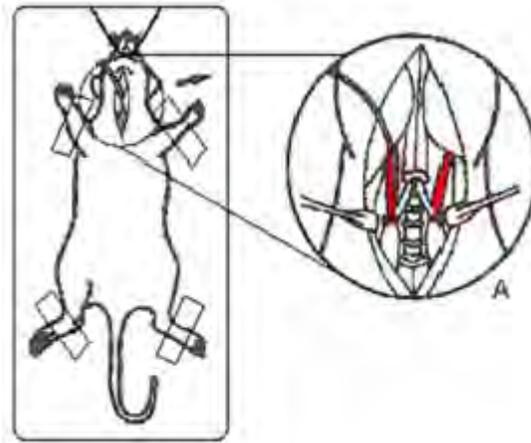
Se utilizaron 140 ratones machos sanos de 8 meses de edad, provenientes de la cepa CFW (obtenidos inicialmente de la casa Taconic Farma Germantown, NY), que fueron adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM; sin exposición previa a otros tratamientos. Los animales se colocaron en una misma sala con temperatura controlada, con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 (luz de 7 a.m. a 7 p.m.). Se permitió que los animales se adaptaran a las condiciones ambientales descritas durante 3 días, previo a los experimentos. Durante todo el experimento se proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron conforme a la ética experimental de la Declaración de Helsinki y a lo establecido en el Reglamento de la Ley General en Materia de Investigación para la Salud de México (NOM-062-ZOO-1999, Secretaria de Salud).

#### **3.2 Técnicas**

##### **3.2.1 Inducción de isquemia cerebral aguda.**

La ICA se indujo mediante el procedimiento quirúrgico del modelo SSACC (Rodríguez et al., 2000). El procedimiento se realizó bajo anestesia leve con éter, y tras fijar al ratón en una tabla de operación que permite extender sus extremidades y cuello, se comenzó con una incisión en la cara anterior del cuello (Fig. 10), para después separar cuidadosamente la arteria carótida común izquierda del nervio vago, posteriormente entre dos ligaduras se seccionó la arteria (excepto el grupo

Sham a los cuales solo se les manipuló la arteria carótida sin seccionar ni ligar). Por último se cerró la incisión con hilo quirúrgico. Después de la cirugía, los animales fueron colocados en un área de recuperación alrededor de 60 minutos. Una vez recuperados fueron devueltos a sus cajas habitación. Treinta y dos días después de la sección de la arteria carótida izquierda, se realizó el mismo procedimiento con la arteria carótida derecha.



**Figura 10.** Procedimiento quirúrgico realizado a los sujetos SSACC Y SHAM. El sujeto es fijado de las extremidades anteriores y superiores, así como de los dientes superiores para restringir sus movimientos durante la cirugía, y exponer el área quirúrgica. **A:** ilustra las arterias carótidas comunes ligadas y cortadas en el caso de los grupos SSACC, y únicamente manipuladas en los grupos Sham (Tomada y modificada de Hernández Aguilar, 2013).

### 3.2.2 Tratamiento farmacológico

Se pretendió determinar el efecto neuroprotector de la Agmatina exógena 100mg/kg aplicándola intraperitonealmente (i.p) al grupo “SSACC con Agmatina” y “Sham con Agmatina” 15 minutos después de la segunda cirugía de acuerdo a lo reportado (Rodríguez et al., 2003) en una sola dosis de 100mg/kg determinada en anteriores hallazgos (Mejía González , Chaidez Ramírez, Vidal Cantú , & Granados Soto, s/f; Martínez, et al., 2012).

### 3.2.3 Evaluación de déficits neuroconductuales característicos del modelo SSACC posterior a la segunda cirugía.

La evaluación de los déficits neuroconductuales se realizó antes de efectuar la anestesia para la segunda cirugía con el objetivo de obtener una línea base, además se realizaron dos evaluaciones más a las 24 y 72 horas posteriores a la segunda cirugía para determinar el daño producido por el modelo y los efectos de la Agmatina exógena (100mg/kg) en la modificación de los déficits descritos en estudios anteriores (Rodríguez, Santiago Mejia, Gómez, & Ramirez San Juan, 2005) producidos por el modelo SSACC.

Se evaluaron diferentes aspectos correspondientes a la Escala de Discapacidad Neurológica (NDSS) tomando en cuenta la presencia o ausencia de las siguientes alteraciones:

Hipomobilidad, postura lateralizada, postura aplanada, marcha atáxica, caminar en círculos, temblores, sacudimientos, convulsiones, respiración irregular, pasividad, hiperreactividad, irritabilidad, poliuria, decremento de tono corporal, flexión de miembros anteriores, disminución de fuerza muscular, rotación corporal, incoordinación motora, hipoalgesia, hiperalgesia, ptosis palpebral, piloerección, y espalda encorvada.

La evaluación tuvo una duración entre 3 y 4 minutos por sujeto, puntuando de la siguiente manera en función de los déficits presentados:

**Tabla 2.** Escala de discapacidad neurológica (tomada de Rodríguez et al., 2005).

<b>Escala de Discapacidad Neurológica (NDSS)</b>	
<b>Grado de déficit</b>	<b>Alteraciones Neuroconductuales</b>
0	Ninguna
2	Hipomobilidad (leve) Pasividad
4	Hipomobilidad (moderada) Postura aplanada Postura lateralizada Espalda encorvada Marcha atáxica Piloerección Decremento de tono corporal Decremento de fuerza muscular Incoordinación motora (leve)
6	Caminar en círculos Temblores/ sacudimientos/convulsiones Flexión de extremidades anteriores Incoordinación motora (moderada)
8	Hipomobilidad (severa) Incoordinación motora (severa) Respiración irregular
10	Muerte (debido a SSACC)

### **3.3 Estudios histológicos**

#### **3.3.1 Perfusión**

Los animales se anestesiaron con Pentobarbital Sódico (6.3%) (Pisabental), se perfundieron con solución salina (0.9%) y fijaron con formol (10%). Posteriormente se extrajeron los cerebros y se seccionaron en tres partes separando áreas frontales anteriores al quiasma óptico y partes posteriores al

cerebelo; la parte medial del corte se conservó en formol bromuro hasta su uso. Para el análisis histológico los cerebros perfundidos fueron hiperbromurados sumergiéndolos en formol bromuro y manteniéndolos en constante movimiento a baño maría con una temperatura entre 45°-50° C por 20 minutos, transcurrido este tiempo fueron crioprotegidos en Sacarosa al 30% durante 24 horas para posteriormente seccionarlos con un criostato (American Optical) en cortes coronales de 30 micras. La técnica histológica fue realizada con base en estudios previos (Cano Díaz, 1985; Baratas Díaz, 1997; Castellanos López & González de Mingo, 1995; Rugerio y Vargas, Ortiz Hernández, Parra Gámez, Ramírez Escoto, Velasco Ruíz & Peralta Zamora, 2010). Posterior a la obtención de los cortes coronales, se seleccionaron aquellos en los que se presentaba el área CA1 de hipocampo, y se sometieron a la técnica de doble impregnación metálica de Pio Del Rio Hortega para evidenciar la presencia de microglía en sus diferentes fases de activación (Cano Díaz, 1985).

### **3.3.2 Técnica histológica de Doble Impregnación metálica de Del Río Hortega**

Se colocaron los cortes seleccionados que presentaban CA1 de hipocampo en agua bidestilada tras su recuperación del criostato (American Optical), posteriormente se lavaron en agua bidestilada con 20 gotas de amoniaco durante 10 minutos a temperatura ambiente, el siguiente lavado se realizó con agua bidestilada para su posterior impregnación en carbonato de plata amoniacal durante media hora en constante movimiento a temperatura ambiente.

Una vez transcurridos los 30 minutos se lavaron las muestras en formol al 1% durante 30 segundos cada corte para su revelado, enseguida se repitió un lavado en agua bidestilada. Una vez realizado lo anterior se viraron los cortes en cloruro de oro durante 15 minutos a temperatura ambiente en constante movimiento; por último los cortes fueron lavados en hiposulfito de sodio (5%) para su posterior montaje en portaobjetos gelatinizados (Rugerio y Vargas, et al., 2010).

Una vez montadas las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en orden en las siguientes sustancias durante 5 minutos por cambio:

-Agua bidestilada

-Alcohol (70%)

-Alcohol (96%)

-Alcohol (100%)

-Xilol- Alcohol (100%) (50%-50%)

-Xilol (100%)

Al terminar los cambios anteriores se encapsularon las preparaciones con Entellan para su posterior análisis.

Para una mejor impregnación la técnica se realizó en un máximo de tres días, a partir de la perfusión de los animales.

### **3.4 Procedimiento Experimental**

Los grupos experimentales fueron divididos en 11 bloques todos con las mismas condiciones de hábitat, fueron desfasados con espacios de una semana para facilitar el análisis histológico.

Cada semana fueron obtenidos del bioterio central 13 sujetos, excepto la primer semana en donde se obtuvieron solo 10, al momento de su llegada al nuevo bioterio se dividieron los grupos experimentales en diferentes cajas habitación de la siguiente manera: 1 sujeto Control, 2 Sham, y los restantes considerados como grupos SSACC fueron divididos en 2 cajas habitaciones con 5 sujetos por cada caja habitación.

Se consideró un periodo de habituación al nuevo bioterio de 3 días, después éste periodo se llevó a cabo la primer intervención quirúrgica que comprende el modelo de ICA SSACC en los grupos Sham y SSACC con sus respectivas variaciones.

Después de efectuada la primer cirugía se regresó a los sujetos a su caja habitación correspondiente y se monitoreó su sobrevivencia en los periodos post quirúrgicos comprendidos de las 0-24 horas, 24-48 horas, 48-72 horas.

Una vez transcurridos los 32 días indicados por el modelo para la realización de la segunda cirugía se pesó a los sujetos para determinar la dosis para cada sujeto fármaco posteriormente asignado al azar. Dadas las condiciones quirúrgicas, de tratamiento farmacológico, y de sobrevivencia tras la segunda cirugía, los grupos quedaron divididos en 5 condiciones experimentales conformados de la siguiente manera:

- Grupos control (sin manipulación quirúrgica)
  1. Grupo control (n=11) con administración de solución salina (0.9%).
- Grupos Sham (con manipulación quirúrgica sin seccionamiento de las arterias carótidas comunes)
  2. Grupo Sham (n=9) con administración de solución salina (0.9%).
  3. Grupo Sham (n=10) con administración de agmatina (100ml/kg).
- Grupos SSACC (con manipulación quirúrgica y seccionamiento de arterias carótidas comunes).
  4. Grupo SSACC (n=18) con administración de solución salina (0.9%).
  5. Grupo SSACC (n=27) con administración de agmatina (100ml/kg).

Una vez realizada la segunda cirugía se efectuó la administración del fármaco asignado a cada sujeto que sobrevivió después de los 15 minutos tras los cuales se indica el tratamiento farmacológico y se monitoreó su sobrevivencia al igual que después de la primer cirugía en los periodos post quirúrgicos comprendidos de las 0-24 horas, 24-48 horas, 48-72 horas.

También se realizó la evaluación de déficits neuroconductuales correspondiente a las indicaciones de la evaluación NDSS en tres periodos teniendo

en cuenta una línea base realizada antes de efectuar la cirugía, y en los periodos postquirúrgicos de 0-24 horas y de las 48-72.

Una vez realizada la última evaluación de déficits neuroconductuales se procedió con el sacrificio de los animales para el posterior procesamiento del tejido encefálico con la técnica de doble impregnación metálica de Pio del Rio Hortega.

Tras el término de las 11 semanas de experimentación se realizó el análisis histológico de las muestras obtenidas.

### **3.5 Análisis estadístico**

Se realizaron los cálculos de sobrevida en los periodos de 24, 48 y 72 horas posteriores a la segunda cirugía mediante el método Kaplan-Meier y se compararon usando la prueba de rangos logarítmicos.

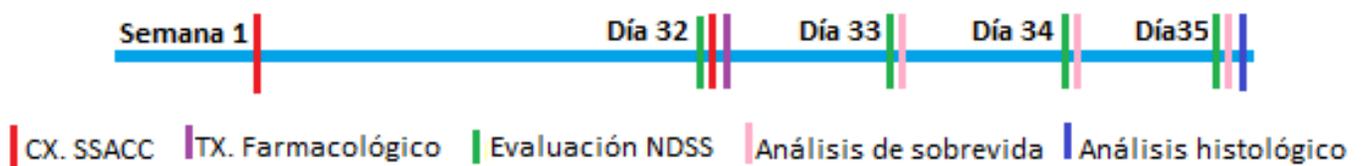
Para el análisis de los déficits neuroconductuales resultantes del modelo SSACC se utilizó la escala de evaluación NDSS (Rodríguez, Santiago Mejía, Gómez, & Ramirez San Juan, 2005) y se compararon las medianas de las puntuaciones obtenidas por los diferentes grupos experimentales con las pruebas Friedman, Pos Hoc Wilcoxon para determinar el comportamiento de los grupos experimentales en los diferentes tiempos de observación, y la prueba Kruskal Wallis, con un análisis Pos Hoc U de Mann Whitney para comparar las medianas entre los grupos experimentales.

Los datos histológicos se obtuvieron tras dos conteos correspondientes a microglía reactiva e inactiva en el área CA1 de hipocampo tomando en cuenta diferentes estados de activación en el caso de la microglía reactiva. Los datos obtenidos en ambos conteos se analizaron por separado con el test Kruskal-Wallis para identificar las diferencias entre las medianas de los grupos y un análisis Post hoc U de Mann Whitney.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS Statistics 22.

### 3.6 Cronograma Experimental

#### *Inducción de isquemia*



#### *Técnica histológica*

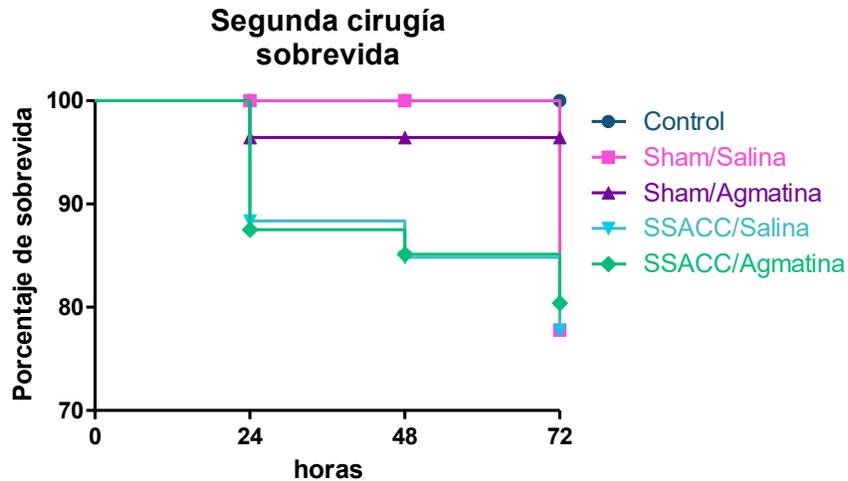


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Mortalidad

Para la primera cirugía se dividieron 3 grupos dada la manipulación quirúrgica por lo tanto se consideró para el grupo control una n=11, para el grupo SSACC n=107, y para el grupo Sham una n=22. Después de la primera cirugía excluyendo al grupo control, debido a la manipulación quirúrgica, y en un lapso de observación de 0 a 72 horas postquirúrgico murieron 13 sujetos pertenecientes al grupo SSACC y un sujeto perteneciente al grupo Sham. Durante el periodo de los 32 días que distancian las cirugías ya descritas que conforman el modelo SSACC se registraron 8 muertes del grupo SSACC y una del grupo Sham. La sobrevida se registró después de haber sido efectuada la segunda cirugía.

Para la segunda cirugía el grupo control conservó una n=11, los grupos SSACC y Sham se dividieron respecto al fármaco administrado resultando entonces los siguientes grupos con sus respectivas n, grupo sham/salina una n=9, grupo sham/agmatina una n= 10, grupo SSACC/Salina n=18, el grupo SSACC/agmatina una n= 27. Las n mencionadas se consideraron como un 100% de los grupos a partir de lo cual se registró la sobrevida en los periodos de 0 a 24 horas, de 24 a 48 horas y de 48 a 72 horas postquirúrgico (Fig.11). Se consideró como grupo SSACC a aquellos sujetos que fueron sometidos a procedimiento quirúrgico pero no sobrevivieron para la administración de un tratamiento farmacológico.



**Figura 11.** La gráfica muestra los porcentajes de sobrevida después de la segunda cirugía de los diferentes grupos experimentales, en los distintos tiempos de registro.

- Grupo control

De acuerdo a los porcentajes arrojados por la prueba de rangos logarítmicos el grupo control tuvo un porcentaje de sobrevida del 100% a las 24, 48 y 72 horas. Sin datos de bajas experimentales registrados tras la administración de solución salina (0.9%).

- Sham/salina

El grupo Sham/Salina conservó un porcentaje de sobrevida de 100% para las 24 y 48 horas, sin embargo en el lapso de las 72 horas se registraron dos muertes experimentales conservando un 77.77%.

- Grupo Sham/agmatina

Los datos obtenidos mostraron que tras la muerte experimental de 1 sujeto el grupo conservó un 96.42% de sobrevida durante las 3 observaciones.

- Grupo SSACC/salina

Referente a los grupos isquémicos, el grupo experimental SSACC/Salina obtuvo a las 24 horas un 88.37% de sobrevida registrándose en este periodo 5

muerdes experimentales, mientras que para el periodo de las 48 horas éste porcentaje disminuyó tras la muerte de 1 sujeto conservando un 84.83% de sobrevivida a las 48 horas y un 77.76% para las 72 horas tras la muerte de 1 sujeto más. Este grupo obtuvo diferencias estadísticas ( $p=0.0254$ ) en el periodo de observación 72 horas respecto al grupo control (Fig.11). Los datos reflejan el impacto inmediato de la cirugía y la evolución del daño a lo largo del tiempo.

- Grupo SSACC/Agmatina

Tras la manipulación quirúrgica y la administración de agmatina 100ml/kg se registró una sobrevivida de 87.50% a las 24 horas tras la muerte de 8 sujetos experimentales, luego de las 24 horas se registró 1 muerte experimental conservando así un porcentaje de 85.13% a las 48 horas y un 80.40% a las 72 horas con la muerte de 1 sujeto más. Como lo reflejan los datos el grupo que recibió el fármaco en comparación con el que sólo recibió el vehículo (salina 0.9%) mantuvo un porcentaje de sobrevivida más alto, sin diferencias significativas. Se presentaron diferencias estadísticas ( $p=0.0296$ ) entre el grupo control y el grupo SSACC/Agmatina después de las 72 horas, evidenciando que aún con el tratamiento farmacológico el impacto de la cirugía es considerable (Fig.11).

#### 4.2 Perfil Neuroconductual

Para determinar las alteraciones en el perfil neuroconductual del modelo SSACC producidas por las diferentes condiciones experimentales se llevó a cabo la prueba Friedman, y un análisis pos hoc Wilcoxon para la comparación de las medianas de los grupos experimentales, con los horarios de observación correspondientes a 0 (línea base), 24, y 72 horas.

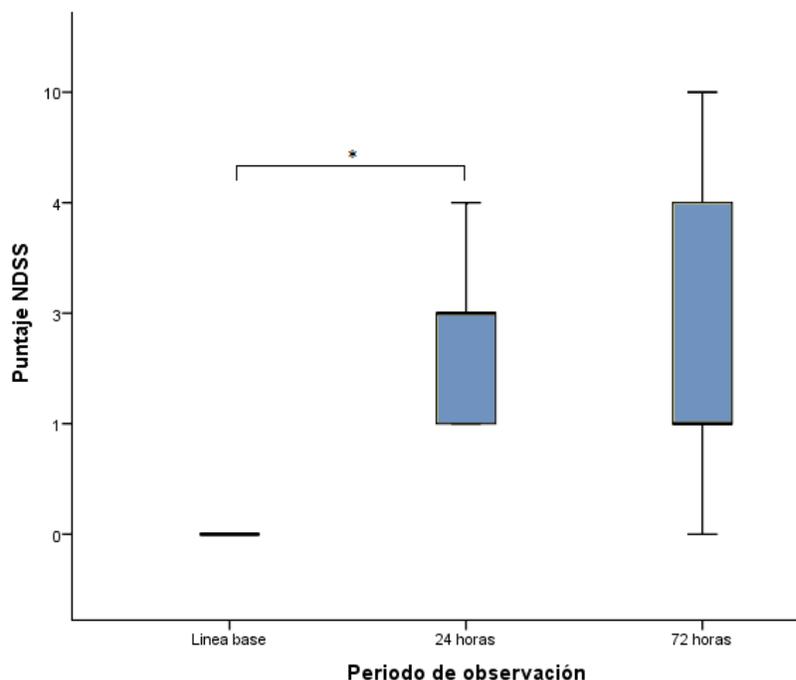
- Grupo control

La comparación de las medianas de la puntuación NDSS para el grupo control no mostró diferencias estadísticas ( $X^2= 18.182$ ,  $p < 0.000$ ,  $gl=1$ ) en los tres periodos de evaluación, Línea base ( $Md=0.00$ ), 24 ( $Md=0.00$ ) y 72 horas ( $Md=0.00$ ) siendo

ausentes todos los signos neurológicos provocados por el modelo SSACC, a excepción de un sujeto que mostró hiperreactividad e irritabilidad por causas ajenas a la manipulación quirúrgica.

- Grupo Sham/Salina

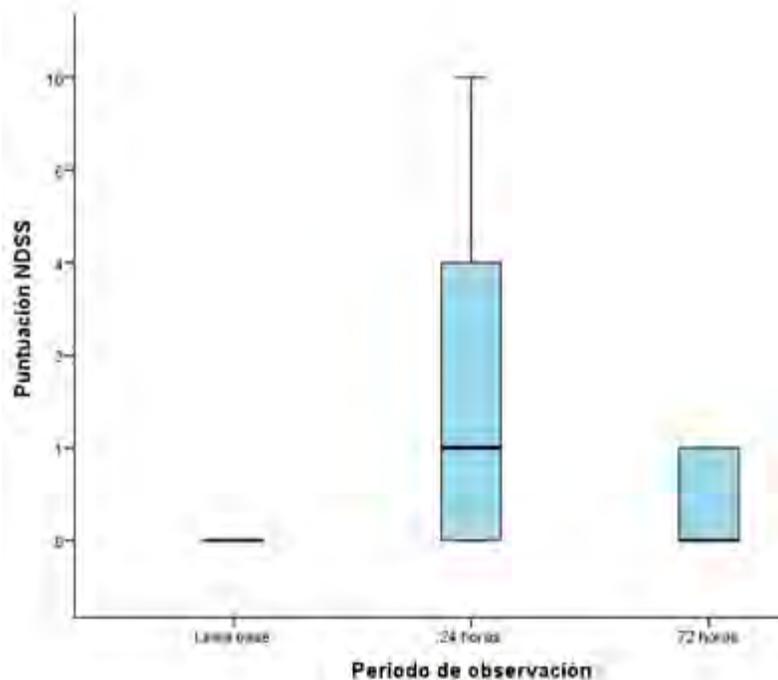
Los resultados de la prueba Friedman demostraron que la puntuación NDSS del grupo Sham/salina (Md= 0.00) presentó diferencias ( $X^2= 18.182$ ,  $p < 0.000$ ,  $gl=1$ ); por otro lado, se confirmó con la prueba post hoc de Wilcoxon la existencia de diferencias significativas ( $p= 0.026$ ) entre las medianas del periodo de observación línea base (Md= 0.00) y el periodo de observación 24 horas (Md= 3.00). Durante el periodo de observación 72 horas se presentaron dos muertes experimentales, y en dos casos la evidencia conductual de signos neurológicos provocados por el modelo SSACC desaparecieron en su totalidad (Fig.12).



**Figura 12.** Se puede observar la comparación de las medianas de la evaluación de déficits cognitivos en ratones del grupo Sham/Salina en los diferentes periodos de observación línea base, 24 y 72 horas después de la administración.

- Grupo Sham/agmatina

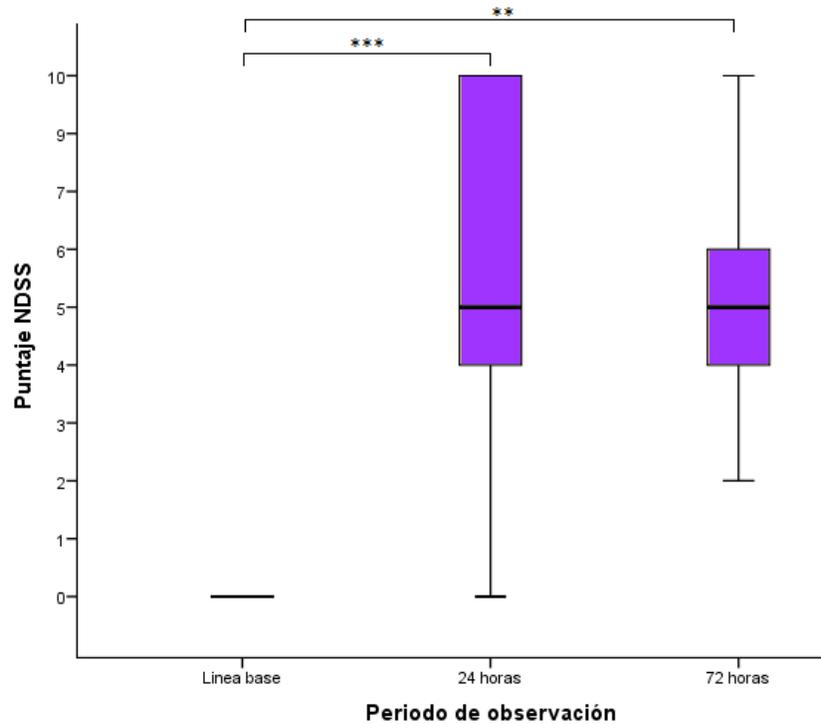
La puntuación NDSS del grupo Sham/agmatina (Md= 0.00) no presentó diferencias significativas ( $X^2= 0.889$ ,  $p= 0.346$ ,  $gl= 1$ ) durante los tres periodos de evaluación tras aplicar la prueba de Friedman.



**Figura 13.** La figura muestra la comparación de las medianas de la evaluación NDSS en ratones del grupo Sham/Agmatina en los diferentes periodos de observación.

- Grupo SSACC/Salina

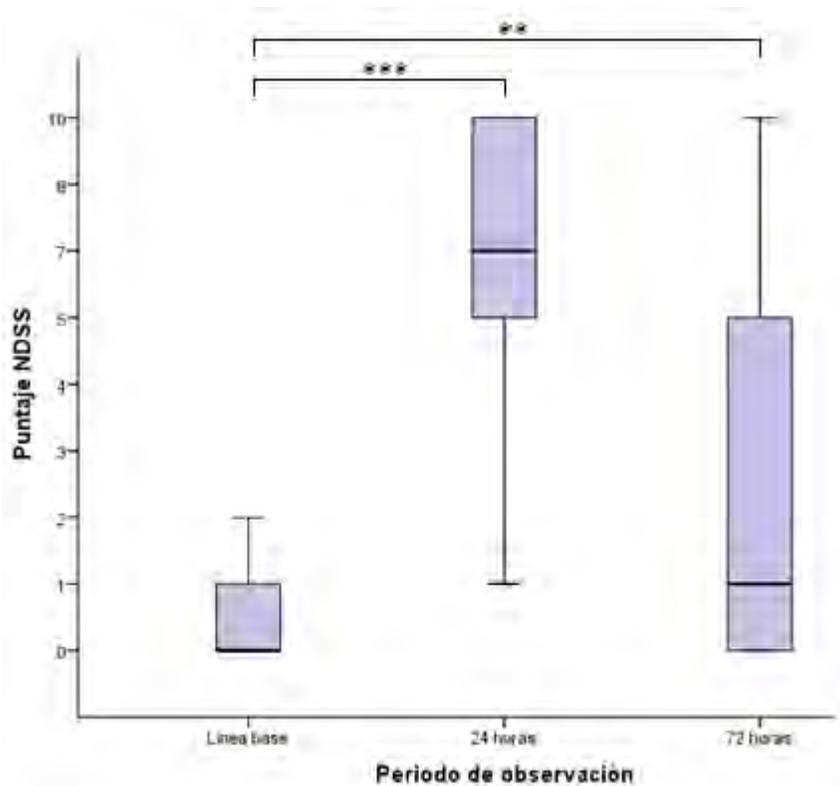
La aplicación de la prueba Friedman arrojó diferencias significativas entre las medianas de las puntuaciones NDSS del grupo SSACC/Salina (Md= 4.00) presentó diferencias significativas ( $X^2= 26.133$ ,  $p= 0.000$ ,  $gl= 1$ ) durante los tres periodos evaluación, la prueba Wilcoxon confirmó la diferencia entre la mediana del periodo de observación Línea base (Md= 0.00), comparada con las medianas del periodo 24 (Md= 5.00,  $p= 0.001$ ) y 72 horas (Md= 5.00,  $p= 0.008$ ). Ambas comparaciones reflejan el aumento del puntaje en la prueba NDSS a lo largo del tiempo (Fig.14).



**Figura 14.** La figura muestra la comparación de las medianas de la evaluación NDSS en ratones del grupo SSACC/Salina en los diferentes periodos de observación, y las diferencias estadísticas entre el periodo línea base comparado con los periodos de 24 y 72 horas.

- Grupo SSACC/Agmatina

El estadístico Friedman arrojó diferencias significativas entre las medianas de las puntuaciones NDSS del grupo SSACC/Agmatina (Md= 4.00) presentó diferencias significativas ( $X^2= 26.133$ ,  $p= 0.000$ ,  $gl= 1$ ) durante dos periodos de evaluación confirmados por la prueba Wilcoxon referentes a la mediana del periodo de observación Línea base (Md= 0.00), comparada con las medianas del periodo 24 (Md= 7.00,  $p= 0.000$ ) y 72 horas (Md= 3.00,  $p= 0.008$ ). Los datos muestran que existe un aumento en la presencia de signos neurológicos de daño ocasionados por el modelo SSACC a lo largo del tiempo (Fig.15).



**Figura 15.** La figura muestra la comparación de las medianas de los puntajes obtenidos en la evaluación NDSS en los tres diferentes intervalos de observación para el grupo SSACC/Agmatina y las diferencias significativas.

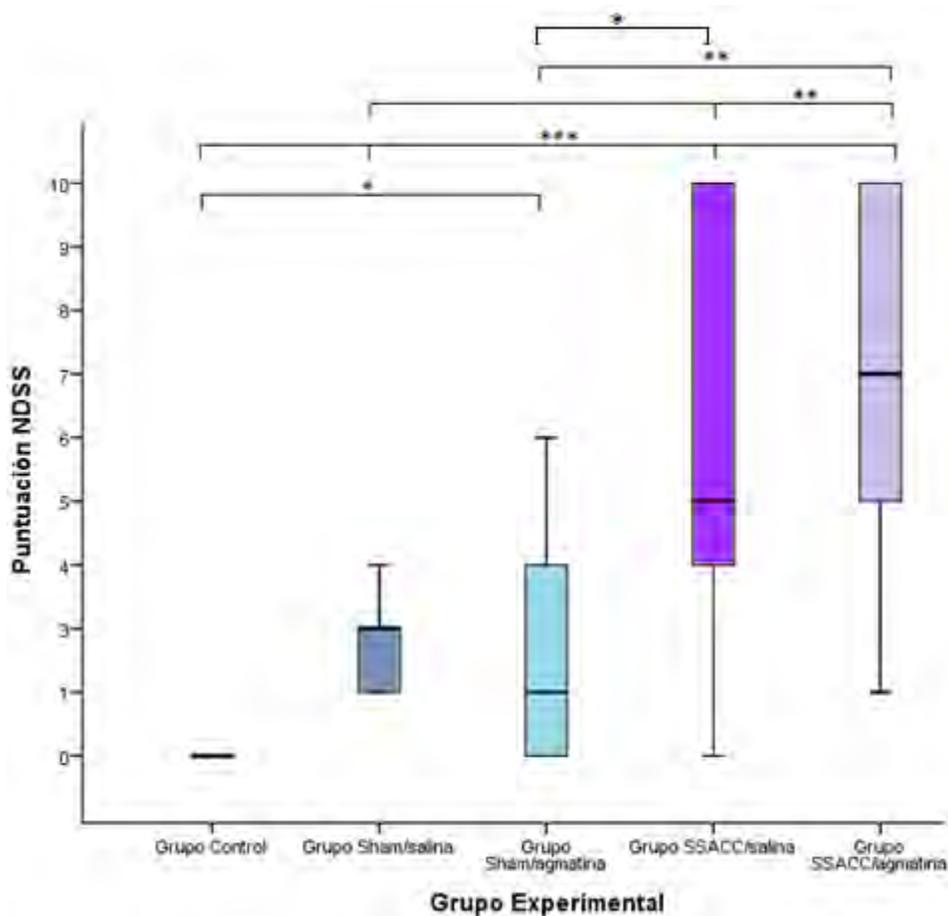
Posteriormente se compararon por medio de la prueba Kruskal Wallis y un análisis post hoc U de Mann Whitney todos los grupos experimentales en los diferentes intervalos de observación para determinar si se presentaron diferencias estadísticas entre grupos respecto a los diferentes intervalos de observación con lo cual se encontró lo siguiente:

- Intervalo de observación Línea Base.

Durante este intervalo de observación la mediana de los puntajes NDSS de todos los grupos experimentales no presentaron diferencias significativas entre sí ( $X^2= 3.465$ ,  $p= 0.483$ ,  $gl= 4$ ) de acuerdo a lo arrojado por la prueba Kruskal Wallis.

- Intervalo de observación 24 horas.

Respecto a las medianas de los puntajes de las evaluaciones NDSS en el periodo de observación 24 horas, se encontraron diferencias estadísticas ( $X^2=35.409$ ,  $p=0.000$ ,  $gl=4$ ) en el análisis Kruskal Wallis, por lo cual se realizó un análisis post hoc U de Mann Whitney, con lo cual se hallaron diferencias entre la mediana del grupo control (0.00) y la correspondiente a los grupos Sham/Salina (Md=3.00) ( $z=-3.711$ ,  $p=0.000$ ), Sham/Agmatina (Md=1.00) ( $z=-2.486$ ,  $p=0.013$ ), SSACC/Salina (Md=5.00) ( $z=-4.248$ ,  $p=0.000$ ), y SSACC/Agmatina (Md=7) ( $z=-0.705$ ,  $p=0.000$ ). Así como entre la mediana del grupo Sham/Salina comparado con las medianas de los grupos SSACC/Salina ( $z=-2.616$ ,  $p=0.009$ ), y SSACC/Agmatina ( $z=-3.020$ ,  $p=0.003$ ), y entre la mediana del grupo Sham/Agmatina en contraste con las correspondientes a los grupos SSACC/Salina ( $z=-2.549$ ,  $p=0.011$ ), y SSACC/Agmatina ( $z=-3.006$ ,  $p=0.003$ ). Los resultados de la comparación de medianas indican que existe un efecto inmediato de la hipoperfusión evidenciado en la evaluación con la presencia de signos neurológicos que reflejan el daño (Fig.16).

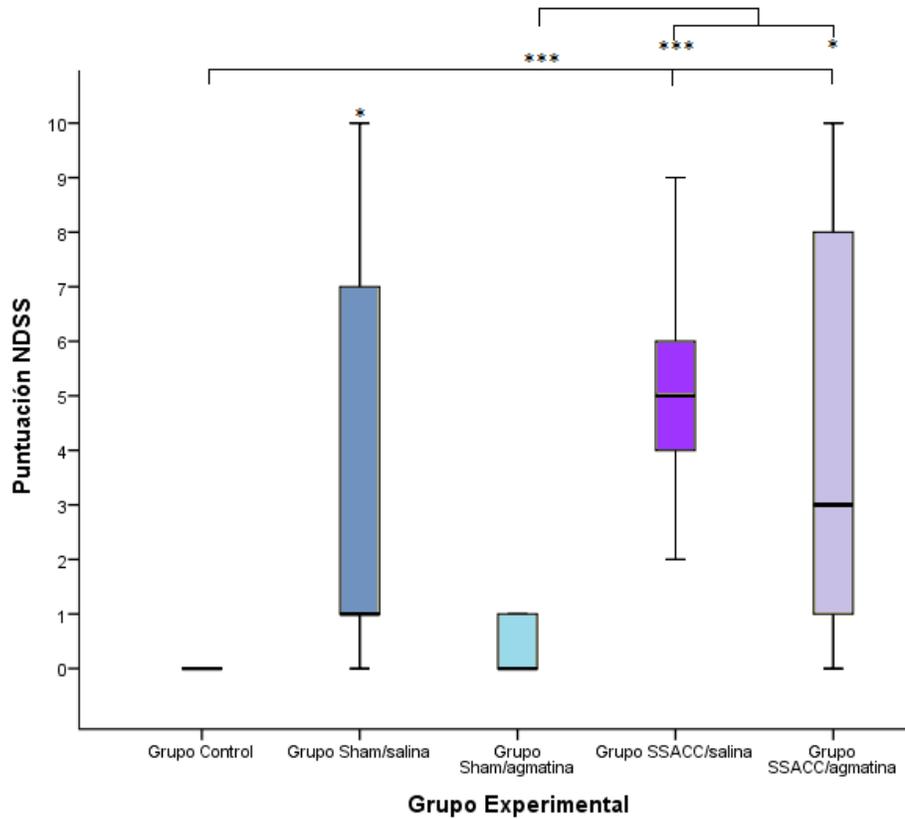


**Figura 16.** En el gráfico se muestra la comparación de las medianas de los puntajes obtenidos por los grupos experimentales en la evaluación NDSS hecha en el intervalo de observación 24 horas.

- Intervalo de observación 72 horas

Por medio del mismo procedimiento estadístico se compararon también las medianas de los puntajes obtenidos en la evaluación NDSS realizada durante el intervalo de observación de 72 horas, con lo cual se encontraron diferencias estadísticas ( $\chi^2= 24.568$ ,  $p= 0.000$ ,  $gl= 4$ ) entre el grupo Control ( $Md=0.00$ ) respecto a los grupos Sham/Salina ( $Md=1.00$ ) ( $z= -2.761$ ,  $p=0.006$ ), SSACC/Salina ( $Md=5.00$ ) ( $z= -4.177$ ,  $p=0.000$ ), y SSACC/Agmatina ( $Md=3.00$ ) ( $z= -3.744$ ,  $p=0.000$ ). De la misma forma se encontraron diferencias entre la mediana del grupo Sham/Agmatina ( $Md=0.00$ ) comparada con las correspondientes a los grupos

SSACC/Salina ( $z = -3.194$ ,  $p = 0.001$ ), y SSACC/Agmatina ( $z = -2.236$ ,  $p = 0.025$ ) (Fig.17).



**Figura 17.** La gráfica ilustra la comparación de medianas de los puntajes obtenidos en la evaluación NDSS durante el intervalo de observación a las 72 horas.

### 4.3 Conteo Microglial

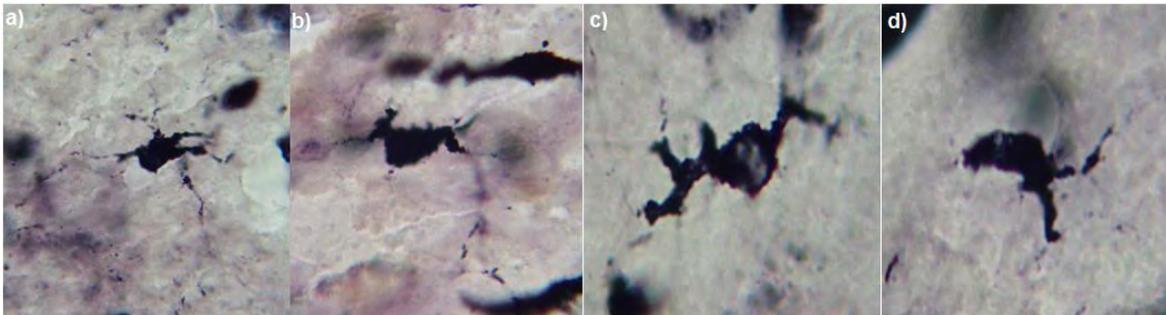
Para el análisis histológico se consideraron solamente 3 de los grupos anteriormente señalados, grupos Control ( $n=9$ ), SSACC/Salina ( $n=7$ ), y SACC/Agmatina ( $n=11$ ).

El conteo de las células microgliales se llevó a cabo en dos fases la primera comprendió el conteo de la microglía reactiva en diferentes fases y la segunda el conteo de la microglía en reposo. En ambos casos el conteo se dividió a su vez en los diferentes estratos del hipocampo (polimorfo u oriens, piramidal y molecular).

Cabe mencionar que ambos conteos se realizaron con un método a ciegas para disminuir la influencia del observador sobre los resultados.

- **Microglía Reactiva**

En el conteo de la microglía reactiva se incluyeron diferentes etapas o fases de activación las cuales se determinaron con base en datos ya existentes (Rugiero y Vargas, et al., 2010; Fig. 18).



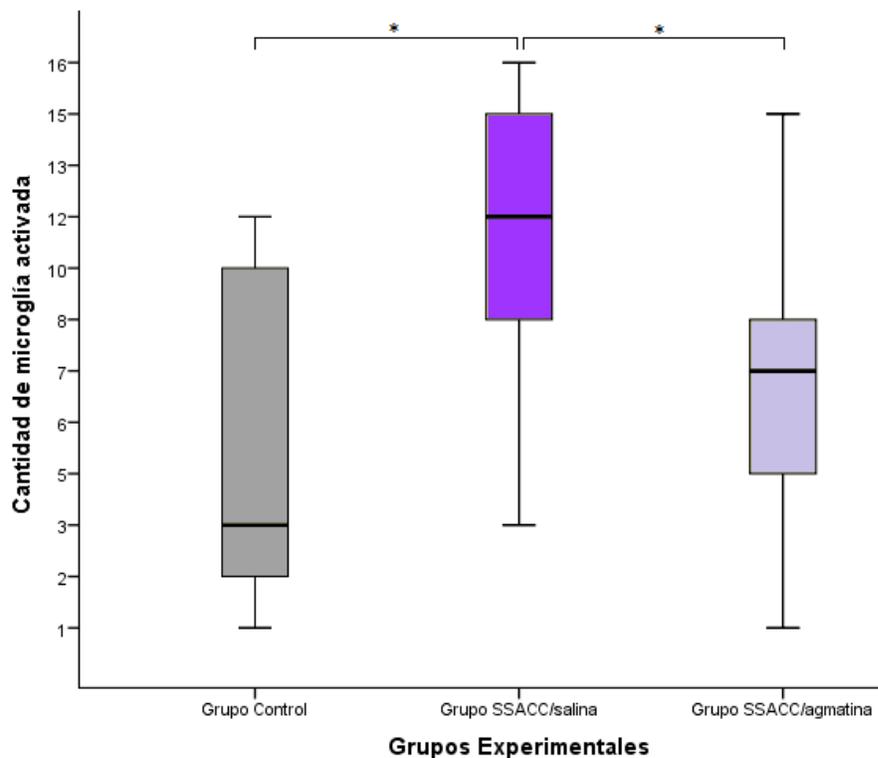
**Figura 18.** Fases de activación Microglial (40x). **a)** y **b)** Ejemplos de microglía macrofágica, la microglía tiende a acortar y disminuir sus prolongaciones hasta adoptar su forma de macrófago, reconociéndose aún las prolongaciones indicativas de su origen, **c)** Muestra célula microglial en estado reactivo fagocitando neurona; **d)** Microglía hipertrófica perineuronal, indicativa de estrés neuronal (Rugiero y Vargas, et al., 2010). Doble impregnación metálica, microglía de del Río Hortega.

Se compararon por medio de una prueba Kruskal Wallis las medianas de los totales del conteo de los diferentes grupos experimentales, además se aplicó una prueba Post-hoc U de Mann Whitney para evidenciar las diferencias específicas entre los grupos experimentales.

- Estrato polimorfo u oriens

Los resultados arrojados por los datos obtenidos en el conteo de éste estrato mostraron diferencias estadísticas entre las medianas del conteo microglial de los grupos experimentales ( $X^2= 6.190$ ,  $p= 0.045$ ,  $gl= 2$ ), el análisis post hoc confirmó diferencias entre la mediana del grupo SSACC/Salina ( $Md=12.00$ ) comparado con

las medianas de los grupos Control (MD=3.00) ( $z = -2.184$ ,  $p=0.029$ ) y SSACC/Agmatina (Md=7.00) ( $z = -2.049$ ,  $p=0.040$ ) (Fig.19).



**Figura 19.** El gráfico ilustra la comparación de las medianas del conteo microglial de los tres grupos experimentales en el estrato polimorfo de CA1 de hipocampo.

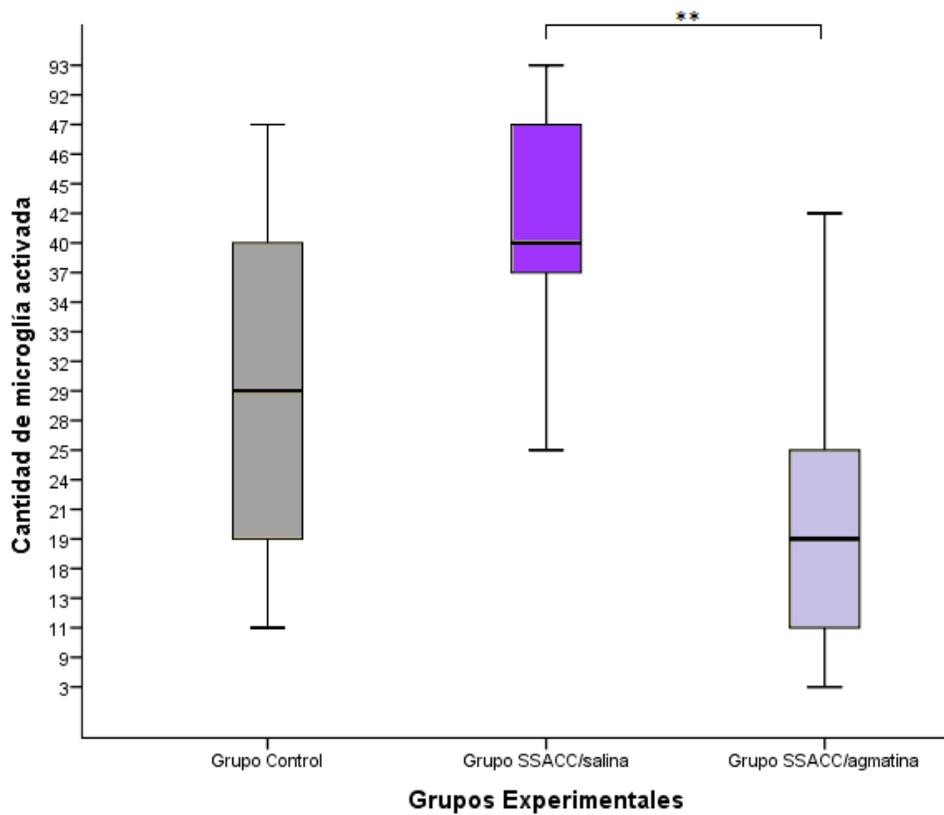
- Estrato Piramidal

Los resultados arrojados por los datos obtenidos en el conteo de éste estrato no mostraron diferencias estadísticas entre las medianas del conteo microglial de los grupos experimentales ( $X^2 = 2.765$ ,  $p = 0.251$ ,  $gl = 2$ )

- Estrato Molecular

Los resultados de las pruebas estadísticas, muestran diferencias significativas ( $X^2 = 10.002$ ,  $p = 0.007$ ,  $gl = 2$ ) entre las medianas de los grupos SSACC/Salina (Md=40.00) y SSACC/Agmatina (Md=19.00) ( $z = -2.946$ ,  $p=0.003$ ).

Estos datos demuestran mayor actividad de microglía reactiva en el grupo que no recibió la Agmatina (Fig. 20).

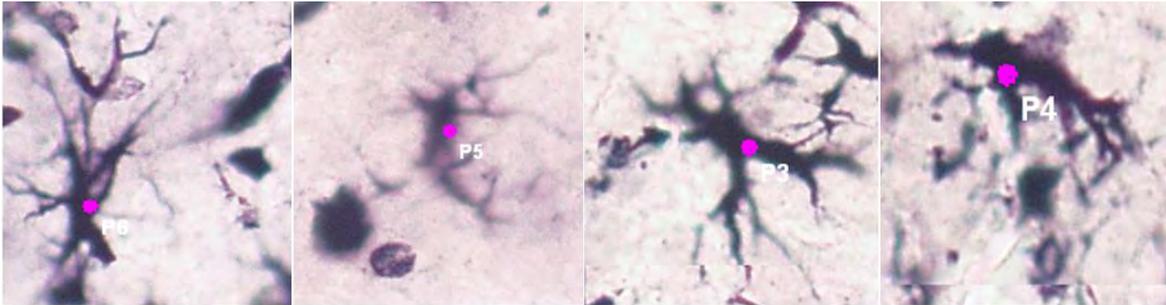


**Figura 20.** La gráfica muestra la comparación de medianas del conteo microglial de los tres grupos experimentales en el estrato Molecular de CA1 de hipocampo.

Por último se repitieron las pruebas estadísticas ya mencionadas con los totales de cada grupo experimental obtenido de los 3 estratos, no se encontraron diferencias significativas.

- **Microglía en reposo**

El conteo de la microglía en reposo se realizó de igual forma que el de la microglía reactiva tomando en cuenta aquellas que se ajustaban a una morfología de acuerdo al estado de interés (Fig. 25).



**Figura 25.** Morfología de células microgliales en estado de reposo (40x), se muestran prolongaciones. Doble impregnación metálica, microglía de del Río Hortega.

Tras comparar por medio de una prueba Kruskal Wallis las medianas de los grupos obtenidas del total del conteo en cada estrato, no se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones de microglía en reposo para ninguna de las condiciones experimentales.

## **5. Discusión**

Existen diversos argumentos del por qué los fármacos neuroprotectores estudiados funcionan en el accidente cerebrovascular experimental, pero no en pacientes con accidente cerebrovascular. En algunos estudios preclínicos, los medicamentos han sido administrados poco después de la oclusión de vasos o incluso antes de la inducción del accidente cerebrovascular experimental, y por lo tanto las condiciones no se ajustan a la situación clínica, puesto que es imposible saber cuándo se presentará dicho accidente de instalación súbita. En la mayoría de los modelos de accidente cerebrovascular animal se utilizan ratas sanas jóvenes, lo cual reduce costes en los laboratorios de investigación, sin embargo los pacientes

con accidente cerebrovascular son a menudo multimórbidos y de edades avanzadas (Röther, 2008)

Es importante considerar que el modelo animal utilizado en éste trabajo, reduce limitaciones de otros modelos animales, con el uso de sujetos envejecidos, tratando de simular en la medida de lo posible, las condiciones clínicas de los pacientes con mayor incidencia de EVC. El modelo SSACC además, permite la simulación clínica de eventos cerebrales transitorios antes de un evento cerebral agudo, esto gracias a los 32 días de separación de las cirugías en los cuales, los sujetos tienen la posibilidad de que su sistema actué de forma compensatoria en consecuencia de la primer cirugía (Rodríguez, et al., 2005). Con lo anterior, el modelo SSACC, ha permitido probar diferentes fármacos con potencial efecto neuroprotector, pues permite conocer con exactitud las alteraciones funcionales neurológicas, y mortalidad provocadas por isquemia cerebral (México Patente nº WO2006057546 A1, 2006).

El objetivo principal de este trabajo consistió en dilucidar si la administración agmatina (100mg/kg) tenía un papel neuroprotector tras EVC inducido con el modelo SSAACC. Para lograr determinar si este efecto neuroprotector era eficaz se evaluaron las variables, mortalidad, déficits neurológicos, concentración de microglía reactiva y concentración de microglía en reposo, tras lo cual se encontró lo siguiente.

- Mortalidad

La tasa de mortalidad que resulta de la ICA inducida por el modelo SSACC es generalmente alta en los estudios que emplean dicha técnica de hipoperfusión (Rodríguez, et al., 2000; Rodríguez, et al., 2003; Rodríguez, et al., 2005; Hernández Aguilar, 2013). Ésta característica es un indicativo de la gravedad del daño que provoca dicha hipoperfusión al tejido cerebral, lo cual se refleja no solo en la mortalidad si no en los diversos daños neurológicos que se evidencian en análisis conductuales (Rodríguez, et al., 2000).

En esta investigación la mortalidad provocada por el modelo SSACC se refleja inmediatamente después de la segunda cirugía en donde la sobrevida baja drásticamente, incluso existieron sujetos que no sobrevivieron el tiempo suficiente para recibir la administración farmacológica asignada. Lo anterior refleja un impacto inmediato del daño neuronal provocado por el infarto inducido, lo cual ocasiona una disminución importante en las n de los grupos experimentales lo que posteriormente dificulta el análisis estadístico de los resultados. Esta complicación nos lleva a utilizar mayor cantidad de animales de laboratorio para un análisis más representativo.

La efectividad de la técnica SSACC permitió en este estudio contrastar los resultados en la sobrevida de grupos con administración de agmatina y sin esta. Lo anterior hizo posible saber si la agmatina realmente tiene un impacto determinante en la recuperación del tejido dañado durante la isquemia inducida. Algunas de las teorías de la neuroprotección que ejerce la Agmatina señalan efectos antiinflamatorios, inhibición de la NOS, y la inhibición de la excesiva reactividad de las células microgliales (Hong, et al., 2011; Abe, et al., 2000; Navarro, 2002). En este estudio no se encontraron resultados que respalden la contribución de la agmatina para incrementar los índices de sobrevida, sin embargo dados los demás datos obtenidos no se descarta la posibilidad de que el efecto neuroprotector podría ser eficaz y reflejarse en esta variable si la agmatina fuese administrada en diferente momento experimental, o diferentes dosis, para lo cual sería pertinente realizar en un primer momento la curva de dosis respuesta de la agmatina para posteriormente probar con diferentes dosis la efectividad de la molécula en la reducción del daño isquémico. Sin embargo por motivos de disponibilidad de animales de laboratorio no fue posible realizar la ya mencionada curva dosis-respuesta, por lo tanto la dosis administrada en este estudio se basó en investigaciones reportadas con anterioridad en otros estudios.

Los grupos Sham del modelo SSACC han creado una controversia respecto a la presencia o ausencia de daño neurológico, ya que, la manipulación de las arterias carótidas podría estar dando paso a una serie de microinfartos, y a su vez a daños

neurológicos de los cuales aún no existe una caracterización específica de las condiciones de estos grupos. En los resultados obtenidos de este trabajo puede observarse que los grupos Sham reaccionaron de forma contraria a los grupos SSACC siendo el grupo Sham con agmatina el que presentó una baja en el índice de sobrevivencia. Es posible que la dosis de agmatina administrada (100mg/kg) en eventos de menor magnitud que la ICA, tenga efectos adversos dado que inhibe la acción microglial, podría estar bloqueando la intervención de la microglía para la reparación celular suscitada después de un evento de compromiso neuronal (Arango Davila et al., 2004). La incógnita de, si la agmatina es perjudicial en estados con menor compromiso neuronal podría quedar clara agregando un grupo control con la administración de la dosis de Agmatina utilizada en este proyecto, para caracterizar el perfil neuroconductual, la supervivencia y su acción sobre las células microgliales.

- Perfil Neuroconductual

El modelo SSACC es viable para determinar la mejoría de algunos déficits neuroconductuales tras la aplicación de algún fármaco con posibles propiedades neuroprotectoras, pues se han caracterizado a detalle los déficits que se presentan en el modelo SSACC, permitiendo así una evaluación observacional y a su vez cualitativa y cuantitativa de las modificaciones derivadas de un tratamiento farmacológico. Así, utilizando la escala NDSS realizada por el Doctor Rodriguez Carranza y su equipo (2005), hemos logrado determinar el grado de neuroprotección de la Agmatina basados en los déficits neuroconductuales presentados por los sujetos.

En este estudio respecto a la evaluación NDSS se encontró un grupo control estable en la ausencia de déficits neurológicos observables en los tres periodos de observación que comprendió el diseño experimental. Exceptuando a un sujeto de dicho grupo que presentó agresividad, sin embargo, al no haber sido sometido a ningún proceso experimental, excepto la aplicación de solución salina, se ha atribuido su reacción a factores de estrés.

En cuanto al grupo Sham/salina, al ser sujetos exentos de la ligadura, y seccionamiento de las arterias carótidas comunes se esperaba que no presentaran daños significativos sin embargo, los resultados indican la presencia de daños neurológicos importantes en el periodo de observación de 24 horas, cabe mencionar, que en el modelo SSACC dicho grupo ha sido motivo de discusión respecto al posible daño que se ocasiona al manipular las arterias carótidas comunes para su separación del nervio vago correspondiente, pues esto podría estar propiciando pequeños microinfartos por la reducción del flujo sanguíneo, y posiblemente daños tisulares por la posterior reperfusión. Los resultados de este estudio demuestran que en efecto existe un daño neurológico significativo en esta condición quirúrgica, dando paso a la posibilidad de considerar en este grupo la prueba de tratamiento farmacológico para un daño menos agudo que con el seccionamiento de las arterias, apostando a la existencia de posibles áreas de recuperación neuronal (Arauz, et al., 2002).

En cuanto al grupo sham/agmatina los resultados no mostraron diferencias significativas, por lo tanto los sujetos no sufrieron un aumento importante de los déficits neurológicos que el modelo propicia, lo cual nos indica que la intervención farmacológica con agmatina amortigua los daños ocasionados por ésta condición quirúrgica, en este punto, se puede hablar de la posible acción neuroprotectora de la Agmatina en el caso de eventos cerebrovasculares transitorios. Éstos resultados son tentativamente atribuibles a las diferentes vías de acción de la Agmatina, principalmente a la inhibición ejercida sobre la NOS que contribuye a una menor generación de radicales libres, así como a su acción inhibitoria sobre la activación microglial y posterior liberación de factores inflamatorios y de necrosis tumoral cerebral (Hong, et al., 2008).

Por otro lado referente a los grupos SSACC, ambos presentaron un incremento significativo en la presencia de déficits cognitivos, dicho incremento se mantuvo incluso en el periodo de observación de 72 horas, es decir, no existió ninguna recuperación significativa, lo cual nos lleva a pensar que en contraste con el grupo Sham/agmatina, podría ser la agmatina un agente más eficaz ante el daño

isquémico transitorio, capaz de contribuir a la conservación de la calidad de las conductas motoras y cognitivas. Para esclarecer este punto en futuros proyectos podría ser conveniente añadir más periodos de observación para caracterizar la modificación de los déficits provocada por la Agmatina, en periodos cortos después de la segunda cirugía, y de ser posible, posteriores a las 72 horas, así como analizar la alteración de conductas motoras finas para contar con un panorama más amplio sobre la modificación conductual, y las estructuras fisiológicas implicadas en ello.

En lo que refiere a las diferencias entre los grupos experimentales éstas fueron inexistentes en el periodo de observación línea base, esto nos habla de la recuperación de los sujetos después de los 32 días de la primera cirugía, lo cual puede indicarnos la efectividad de los sistemas compensatorios que se activan ante un EVC, el ensanchamiento de los vasos sanguíneos, la irrigación colateral, y los procesos inflamatorios con la correspondiente liberación de factores tróficos.

A las 24 horas se observan diferencias esperadas entre el periodo línea base y el resto de los grupos experimentales así como entre los grupos SSACC, y Sham dado el procedimiento quirúrgico al que fueron sometidos, el aumento de déficits cognitivos se observa drásticamente en dicho periodo de observación.

Durante el periodo de observación de 72 horas, el único grupo que se mostró con un decremento de déficits cognitivos significativo, igualando el comportamiento estadístico del grupo control fue el grupo Sham/agmatina, en el cual se logró atenuar el efecto neurológico después de la segunda cirugía, con lo anterior se demuestra el efecto neuroprotector de la agmatina, aun cuando desconocemos la especificidad de sus acciones en este experimento, podemos hablar de la temporalidad de sus efectos, los cuales alcanzan su objetivo 72 horas después de su administración.

Se considera conveniente probar diferentes dosis de agmatina para determinar si existe un efecto más temprano y eficaz, así como un momento de aplicación más oportuno tomando en cuenta que de acuerdo a lo hallado en este proyecto sus efectos atenuantes al daño se presentan hasta después de las 24 horas de aplicación farmacológica. Estos datos sustentan la especulación de que la

aplicación en otro momento experimental podría ser clave para una mayor conservación de la calidad de los procesos motores y cognitivos.

Por otro lado, en lo que respecta a la evaluación NDSS, el entrenamiento del observador para la identificación conductual de los déficits es importante para descartar la influencia de éste, con el fin de garantizar un criterio general de puntaje a la hora de evaluar a los diferentes grupos experimentales, la estimación global del estado funcional, de los animales isquémicos, que proporciona la evaluación permite el seguimiento de las posibles mejoras o deterioros tras la evaluación de comportamientos específicos (Rodríguez, et al., 2003). Para descartar fallas en el puntaje de la evaluación NDSS, se podría considerar la aplicación de una prueba de memoria y aprendizaje que permita contrastar más datos y así correlacionar ambas evaluaciones para tener un criterio más amplio que permita determinar diferentes grados de déficits cognitivos.

- **Conteo microglial**

*Microglía Reactiva*

Para la evaluación de esta variable se consideraron únicamente tres grupos, debido a la complejidad de la técnica histológica y a la exigencia del rápido procesamiento de los tejidos que requiere la misma. Se tuvieron que excluir los grupos Sham/salina y Sham/agmatina. Por lo tanto los resultados presentados resultan de la comparación de los grupos Control (salina), SSACC/Salina, y SSACC/Agmatina, encontrando lo siguiente.

Considerando la suma del total de conteo de microglía en fases reactivas de los tres estratos celulares hipocampales correspondientes a CA1 (Oriens, Molecular y piramidal), pudimos encontrar que los grupos analizados no presentaban diferencias en cuanto a la concentración de células microgliales en estado reactivo, sin embargo, al comparar el conteo de los grupos experimentales para cada estrato hipocampal pudimos encontrar diferencias significativas, en el caso del estrato polimorfo se encontró un aumento significativo de la reactividad microglial del grupo SSACC/salina comparado con el grupo control y el grupo SSACC/agmatina, en lo

que respecta al estrato molecular del mismo modo el grupo SSACC/salina presento un aumento importante en la reactividad microglial comparado con el grupo SSACC/agmatina. Lo anterior nos plantea incógnitas relacionadas con la efectividad de la agmatina respecto a la disminución de los procesos inflamatorios perjudiciales posteriores en este caso a la isquemia cerebral inducida, si esta efectividad es más notoria en ciertos estratos celulares o por otro lado el estrato piramidal podría estar dándonos información acerca de una mayor resistencia al daño provocado por la isquemia. En lo que respecta a este estudio la conservación de una puntuación NDSS alta a las 72h ha coincidido con una mayor reactividad microglial en lo que al grupo SSACC/salina se refiere, contrario al grupo que recibió agmatina el cual a las 72 horas no muestra una disminución significativa de los puntajes pero sí una disminución importante de la reactividad microglial en el estrato molecular de CA1 reflejando la efectividad de la Agmatina como un inhibidor de la actividad microglial y por lo tanto de los procesos desatados tras su reactividad como lo son la liberación de óxido nítrico y de factores inflamatorios, lo cual deja abierta la incógnita de si es realmente capaz de disminuir daños neurológicos característicos del modelo SSACC en una dosis o momento de aplicación diferentes a los utilizados en esta investigación. Además es importante considerar que la especificidad funcional de cada estrato celular hipocampal y los diferentes efectos que causa la agmatina en cada uno, podría abrirnos una puerta para el posible tratamiento de déficits relacionados con el daño en las células de los estratos mencionados no solamente en la isquemia si no en diferentes trastornos.

Los resultados demuestran que un aumento en la actividad microglial puede relacionarse con la extensión del daño provocado por el modelo SSACC, se podría especular que una mayor actividad microglial se puede atribuir también a un mayor aporte de factores relacionados con la reparación neuronal (Arango Davila et al., 2004). Sin embargo, dada la comparación de los datos de la escala NDSS se puede afirmar sustentado por la literatura que la concentración microglial es uno de los indicadores de daño de tejido cerebral ocasionado por la hipoperfusión en este caso inducida (Torregosa et al., 2007). Especialmente en el estrato molecular de CA1 de hipocampo se puede observar una sobre expresión de reactividad microglial, lo cual

podría ser el indicador de una especial susceptibilidad ante la hipoxia de las células que conforman éste estrato. La caracterización del fenotipo de dichas células microgliales podría ayudar a esclarecer la actividad específica que está llevando a cabo la microglía en el tejido dañado.

### *Microglía en reposo*

Los resultados de esta investigación no arrojaron diferencias relevantes respecto a esta variable, sin embargo, al realizar el conteo de microglía en reposo se consideró que sería importante para futuras investigaciones caracterizar la morfología de dichas células en reposo para determinar la temporalidad de la actividad microglial y su interacción específica en diferentes momentos posteriores a la inducción de isquemia debido a que, una mayor concentración de microglía en estado de reposo, podría estar produciendo factores para fomentar la supervivencia de las células y la reparación de los tejidos tras el daño ocasionado por el modelo SSACC (Arango, et al., 2004). Es importante también considerar la inclusión de más grupos en futuro seguimiento de ésta línea de investigación para poder esclarecer, la dosis, temporalidad y efectos sobre la microglía de éste fármaco.

## **6. Conclusiones**

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto neuroprotector de la Agmatina exógena en las alteraciones neuroconductuales inducidas por el modelo SSACC en ratones, y sus efectos en la sobrevivida y concentración microglial en CA1 de hipocampo. Después del trabajo de investigación realizado en busca de obtener respuestas para las interrogantes generadas en ésta tesis, el análisis de los resultados de las diferentes técnicas aquí descritas nos permite concluir lo siguiente:

La Agmatina exógena tiene un efecto neuroprotector disminuyendo los déficits neuroconductuales (después de 72 horas de su aplicación) en eventos transitorios

de hipoperfusión, y la concentración de microglía reactiva en los estratos molecular y polimorfo de CA1 de hipocampo.

1. No hay evidencia de que la administración de Agmatina (100mg/kg) dentro de la ventana temporal de tratamiento haya incrementado las curvas de supervivencia del grupo al cual se le sometió al procedimiento del modelo SSACC después de la segunda cirugía.

2. La administración de Agmatina (100mg/kg) reduce el grado del déficit neuroconductual característico del modelo SSACC después de 72 horas de la segunda cirugía en el caso del grupo Sham.

3. La administración de Agmatina (100mg/kg) reduce significativamente la concentración de microglía reactiva presente en altas concentraciones durante eventos isquémicos lo cual podría correlacionar con la gravedad de la lesión en CA1 de hipocampo, causada por el Seccionamiento Secuencial de Arterias Carótidas Comunes.

4. La Aplicación de la Agmatina dentro de la ventana temporal de tratamiento es una alternativa farmacológica neuroprotectora para el tratamiento de la ICT.

Por todo lo anterior podemos concluir que nuestros resultados apoyan la hipótesis planteada al inicio del proyecto y que por lo tanto la Agmatina puede ser considerada como un fármaco con potencial efecto neuroprotector que contribuye a la disminución de déficits neurológicos característicos del modelo usado.

Tras la realización de éste trabajo se identificaron las siguientes oportunidades de mejoría que podrían ser aplicadas para futuras investigaciones. Entre ellas se encuentran:

- Un aumento de la n de los grupos experimentales, debido a la gran mortalidad que provoca el modelo SSACC, esto permitiría reducir los errores estándar y observar con mayor claridad la diferencia en la supervivencia tras la aplicación de posibles fármacos neuroprotectores.

- La adición de un grupo control con administración de Agmatina para la caracterización de la acción de dicho fármaco en cuanto a conducta, posibles daños neurológicos y concentración microglial se refiere.
- La adición de grupos experimentales que reciban Agmatina en diferentes momentos experimentales al descrito en este proyecto, y diferentes dosis para encontrar la más pertinente para el tratamiento de la ICA.
- Acompañar la evaluación NDSS de alguna prueba de memoria para la mejor discriminación de déficits neurológicos, más relacionados con el aspecto cognitivo, esto permitiría contrastar con datos clínicos la severidad de la lesión y la efectividad del fármaco aplicado en la conservación de capacidades cognitivas contrastando éstos datos con los resultados histológicos.
- La elaboración de una curva de activación microglial podría proveernos información relevante sobre la temporalidad de los eventos inflamatorios relacionados con dichas células y el momento pertinente para tratarlos sin interferir en sus fases de reparación neuronal.
- Dada la dificultad de la realización de la técnica de Doble Impregnación Metálica de Pío del Río Hortega, se recomienda el procesamiento minucioso del tejido a estudiar, y el uso de equipo que permita procesar más de tres muestras (como se hizo en el presente trabajo) a la vez, esto para disminuir las variables extrañas que podrían presentarse al dividir los grupos experimentales en diferentes módulos para su estudio en diferente tiempo.

## 7. REFERENCIAS

- Abe, K., Abe, Y., & Saito, H. (2000). Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Research*, 141-148.
- Agulla, J., Argibay, B., Pérez Mato, M., Brea, D., Ramos Cabrer, P., & Castillo, J. (2011). Comparación de la lesión producida en tres modelos animales de isquemia cerebral focal permanente mediante resonancia magnética. *Revista de Neurología*, 265-274.
- Ahn, S. K., Hong, S., Park, Y. M., Choi, J. Y., Lee, W. T., Park, K. A., & Lee, J. E. (2012). Protective effects of agmatine on lipopolysaccharide-injured microglia and inducible nitric oxide synthase activity. *Life Sciences*, 1345–1350.
- Alcaraz Moreno, N. (Agosto de 2002). Enfermedad cerebrovascular y reflejo de parpadeo como modelo de diagnóstico electrofisiológico temprano. Colima, Colima, México: Universidad de Colima.
- Arana Chacón, A., Uribe Uribe, C. S., Muñoz, B. A., Salinas Durán, F. A., & Celis Mejía, J. I. (s.f). Enfermedad Cerebro Vascular. Asociación Colombiana de Facultades de Medicina ASCOFAME.
- Arango Davila, C., Escobar Betancourt, M., Cardona Gómez, G. P., & Pimienta Jiménez, H. (2004). Fisiopatología de la Isquemia Cerebral Focal: Aspectos Básicos y su Proyección a la Clínica. *Revista de Neurología*, 156-165.
- Arauz, A., Murillo, L. M., & Bonnin, E. (2002). Neuroprotección en isquemia cerebral aguda. Estado actual e importancia clínica de la cascada isquémica. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 53-59.
- Arauz, A., & Ruíz Francob, A. (2012). Enfermedad Vascular Cerebral. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 11- 21.
- Ardila, A., & Ostrosky, F. (2012). Accidentes Cerebrovasculares. En A. Ardila, & F. Ostrosky, *Guía para el diagnóstico Neuropsicológico* (págs. 39- 54).
- Baratas Díaz, L. A. (1997). *Introducción y desarrollo de la biología experimental en España entre 1868 y 1936*. Madrid: CSIC - CSIC Press.
- Bronstein, R., Torres, L., Nissen, J. C., & Tsirka, S. E. (2013). Culturing Microglia from the Neonatal and Adult Central Nervous System. *Journal of Visualized Experiments* .
- Cano Díaz, P. (1985). *Una contribución a la ciencia histológica: la obra de don Pío del Río-Hortega*. Madrid: CSIC - CSIC Press.

- Cantú Brito , C., Ruíz Sandoval, J., Chiquete, E., Arauz, A., León Jiménez, C., Murillo Bonilla, L., . . . RENAMEVASC. (2011). Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 224-234.
- Castellano López , B., & González de Mingo, B. (1995). Contribuciones científicas de Don Pío del Río Hortega a la neurociencia. *Neurología*, 265-276.
- Castellanos , M., Sobrino, T., & Castillo, J. (2006). Evolving Paradigm for Neuroprotection: Molecular Identification of Ischemic Penumbra. *Cerebrovascular Diseases*, 71-79.
- Chaves Sell, F. (2000). Accidente vascular cerebral ¿es el accidente vascular cerebral una enfermedad tratable? *Revista Costarricense de Cardiología*, 27-33.
- Chiquete, E., Ruíz Sandoval, J. L., Murillo Bonilla, L. M., Arauz, A., Villareal Careaga, J., León Jiménez, C., . . . Cantú Brito, C. (2012). Egresos por enfermedad vascular aguda en instituciones públicas del sector salud de México: Un análisis de 5.3 millones de hospitalizaciones en 2010. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 252-258.
- Cuenca López, M. D., Brea, D., Segura, T., Galindo , M. F., Antón Martínez, D., Agulla, J., . . . Jordán, J. (2010). La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Revista de Neurología*, 349-359.
- Dávalos, A., Álvarez Sabín, J., Martí Vilalta, J. L., & Castillo, J. (2003). Tratamiento intravenoso con activador del plasminógeno tisular en la isquemia cerebral aguda. *Medicina Clínica*, 1-5.
- Deb, P., Sharma, S., & Hassan, K. M. (2010). Pathophysiologic mechanism of acute ischemic stroke: An overview with emphasis in therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*, 197-218.
- del Zoppo, G. J. (2006). Stroke and Neurovascular Protection. *The New England Journal of Medicine*, 554-556.
- Diéguez Castrillo, G. (2015). La circulación cerebral. En J. L. Velayos, & G. Diéguez, *Anatomía y Fisiología del sistema nervioso central* (págs. 627-638). Madrid: CEU.
- Díez Tejedor, E., Del Brutto, O., Álvarez Sabin, J., Muñoz, M., & Abiusi, G. (2001). Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Revista de Neurología*, 455-464.
- Dirnagl, U., Iadecola , C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), 391–397.
- Egan, R. (2005). Anatomy and Physiology of the Cerebrovascular System. En N. R. Miller , N. J. Newman, V. Biousse, & J. B. Kerrison, *Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology* (págs. 1901-1916). Lippincott Williams & Wilkins.

- Felten, D. L., & Shetty, A. N. (2010). Vasculatura. En D. L. Felten, & A. N. Shetty, *Netter. Atlas de Neurociencia* (págs. 75-96). España: Elsevier Masson.
- Fernández Gómez , F. J., Hernández, F., Argandoña, L., Galindo , M. F., Segura , T., & Jordán, J. (2008). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Revista de Neurología*, 253-260.
- Halaris , A., & Plietz, J. (2007). Agmatine Metabolic Pathway and Spectrum of Activity in Brain. *CNS Drugs*, 885- 900.
- Hernández Aguilar, D. O. (2013). Modelo de Sección Secuencial de Arterias Carótidas Comunes (SSACC). *Efecto del ambiente enriquecido en las alteraciones del aprendizaje y memoria inducidas por isquemia cerebral aguda*. México, D.F.: Facultad de Psicología UNAM.
- Hong, S., Park, K., Kim, C. Y., & Seong, G. J. (2008). Agmatine inhibits hypoxia-induced TNF-alpha release from cultured retinal ganglion cells. *Biocell*, 201-205.
- Hong, S., Yun Kim, C., Iizuka, Y., Eun Lee, J., & Seong, G. J. (2011). Protective Effects of Agmatine on Hypoxic Microglia through Modulating Nitric Oxide Synthase. *Investigative ophthalmology and visual science*, 52.
- Hospital General de México. (18 de Octubre de 2011). Guías clínicas de Diagnóstico y Tratamiento. Servicio de Medicina Interna; Enfermedad Cerebral Vasculatura Isquémica. México, Distrito Federal.
- Hurtado, O., Moro, M., & Sobrado, M. (2007). Cadena respiratoria mitocondrial y generación de radicales libres en el infarto cerebral. En J. Montaner, *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. (págs. 91-107). Marge Medica Books.
- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (2012). Epidemiología EVC. México, Distrito Federal.
- Janardhan, V., & Qureshi , A. I. (2004). Mechanisms of ischemic brain injury. *Current Cardiology Reports*, 117- 123.
- Jordán, J., Ikuta, I., García García, J., Calleja, S., & Segura , T. (2007). Stroke pathophysiology management challenges and new treatment advances. *Journal of Physiology and Biochemistry* , 261-278.
- Kawasaki, K., Traynelis, S. F., & Dingledine, R. (1990). Different Responses of CA1 and CA3 Regions to hypoxia in Rat Hippocampal Slice. *Journal of Neurophysiology*, 385-394.
- Koizumi, J., Yoshida, Y., Nazakawa, T., & Ooneda , G. (1986). A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischaemic area. *Japanese Journal of Stroke*, 1-8.

- Leciñana, M. A. (2011). Fisiopatología de la Isquemia Cerebral. En A. C. Neurología, *Guía Neurológica 8: Enfermedad Cerebrovascular* (págs. 5-17). Colombia.
- León, R., Pentón, G., Almaguer, W., Marín, J., Cruz, A., Lorigados, L., . . . Bergado, J. (2015). Modelo experimental de hipoperfusión cerebral produce déficit de la memoria y aprendizaje y modificaciones en la expresión de genes. *Acta Biológica Colombiana*, 15-25.
- López Hernández, M. E., & Solís, H. (2005). Cerebral ischemia: some secondary alterations and animal models. *Archivo de Neurociencias*, 160-167.
- Martínez Vila, E., Murie Fernández, M., Pagola, I., & Irimia, P. (2011). Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine*, 4871-4881 .
- Martínez, M. P., Uribe, E. A., Toledo, J. R., González, M., Montero, E., Conteras, E., & Sepúlveda, M. J. (2012). Efecto de Agmatina sobre la expresión génica y actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa neuronal, en ratones dependientes de morfina. *Revista de Farmacología de Chile*, 24.
- Mayo Clinic. (05 de Abril de 2014). *Mayo Clinic*. Recuperado el 30 de Julio de 2014, de Mayo Clinic: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/stroke/basics/definition/con-20042884>
- Mejía González, N., Chaidez Ramírez, P., Vidal Cantú, G. C., & Granados Soto, V. (s/f). La Agmatina produce Analgesia Periférica potente en el Modelo de la Formalina en la rata. *Biblioteca CINVESTAV*, 1-4.
- Milenkovic, I., Nedeljkovic, N., Filipovic, R., Pekovic, S., Culic, M., Rakic, L., & Stojiljkovic, M. (2005). Pattern of Glial Fibrillary Acid Protein Expression Following Kainate- Induced Cerebellar Lesion in Rats. *Neurochemical Research*, 207- 213.
- Molderings, G. J., & Haenisch, B. (2012). Agmatine (decarboxylated l-arginine): Physiological role and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, 351–365.
- Muñoz Collazos, M., Gutiérrez, Á., Londoño, D., Bayona, H., Herrán, S., & Pérez, G. E. (2008). Uso del Activador de Plasminógeno Tisular Recombinante (rt-PA) en el Ataque Cerebrovascular isquémico (ACVi) en Colombia: un estudio de costo-efectividad. *Acta de Neurología Colombiana*, 158-173.
- Navarro, J. F. (2002). Agmatina: perfil farmacológico y efectos conductuales. *Psiquiatría Biológica*, 130-132.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2015). Nota de país: México. *Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care*.
- Pedraza, O. L. (2002). Pontificia Universidad Javeriana. *Universitas médica*, 69-73. Recuperado el 7 de Abril de 2013, de Pontificia Universidad Javeriana: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0020%20Ataque.PDF>

- Reis, D. J., & Regunathan, S. (2000). Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in Pharmacological Sciences Journal*, 187-193.
- Reséndiz, R. (03 de Agosto de 2010). *Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía*. Recuperado el 31 de Julio de 2014, de Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/evascularcerebral.html>
- Rodríguez Acosta, R., Campo Batueca, R., Sarduy Ramos, C. M., & Baez Medina, R. (2004). Infarto Cerebral Isquémico. Comportamiento clínico y tomográfico. *Archivo Médico de Camagüey*.
- Rodriguez Carranza, R. (2006). *México Patente nº WO2006057546 A1*.
- Rodríguez, R., Rodríguez Boscan, I., Lugo Sira, D., Vidrio, H., Hong, E., Medina, M., & Herrera, I. (2000). Bilateral sequential common carotid artery sectioning in mice as a new modal for testing neuroprotective drugs. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease*, 45-53.
- Rodriguez, R., Santiago Mejía, J., Fuentes Vargas, M., & Ramírez San Juan, E. (2003). Outstanding Neuroprotective Efficacy of Dextrazoxane in Mice Subjected to Sequential Common Carotid Artery Sectioning. *Drug Development Research*, 294-302.
- Rodriguez, R., Santiago Mejia, J., Gómez, C., & Ramirez San Juan, E. (26 de Febrero de 2005). A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*(147), 22-28.
- Romano, M. (2011). Mecanismos inflamatorios involucrados en el daño cerebral, isquémico agudo. Posibles blancos terapéuticos. Factores pronósticos. *Neurología Argentina*, 176–181.
- Rosell, A. (2007). Modelos in vivo e in vitro de isquemia cerebral. En J. Montaner Villalonga, *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (págs. 33-44). Barcelona: Marge Medica Books.
- Röther, J. (2008). Neuroprotection Does Not Work! *Stroke*, 523-524.
- Rugiero y Vargas, M. B., Ortiz Hernández, R., Parra Gámez, L., Ramírez Escoto, M., Velasco Ruíz, S., & Peralta Zamora, L. (2010). Tejido nervioso. En P. Rivas Manzano, *Impregnaciones Metálicas. Atlas fotomicrográfico de estructuras subcelulares, células y tejidos animales* (págs. 105- 165). México, D.F.: Las Prensas de Ciencias.
- Silva, F. A., Zarruk, J. G., Quintero, C., Arenas, W., Rueda Clausen, C., Silva, S. Y., & Estupiñán, A. M. (2006). Enfermedad cerebrovascular en Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 85-89.
- Torregosa, G., Salom, J. B., Jover Mengual, T., & Alborch, E. (2007). Fisiopatología básica: De la oclusión arterial a la muerte neuronal. En J. Montaner, *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (págs. 13-31). Marge Medica Books.

Traystman, R. J. (2003). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 85-95.

Uzbay, T. I. (2012). The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 502–519.