



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL DEXRAZOXANO EN LAS ALTERACIONES DEL APRENDIZAJE Y LA
MEMORIA INDUCIDAS POR LA ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA Y SU POSIBLE
PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO NEUROGÉNICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MÉNDEZ CUESTA LUIS ALEJANDRO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de septiembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MÉNDEZ CUESTA LUIS ALEJANDRO** con número de cuenta **303151090**, con la tesis titulada **"EFECTO DEL DEXRAZOANO EN LAS ALTERACIONES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA INDUCIDAS POR LA ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN EL PROCESO NEUROGÉNICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO**:

Presidente: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
Vocal: DR. PAUL CARRILLO MORA
Secretario: DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
Suplente: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
Suplente: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 30 de noviembre de 2016

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría: 412800/262600.

A mi tutora principal la Dra. Claudia Gómez Acevedo y los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca y el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, gracias por su orientación, ayuda y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A mis padres, Teresa y Alberto; quiénes me han apoyado siempre, pero sobre todo me han transmitido su gran amor y fuerza. No existen palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Los amo.

A mis queridos hermanos Ivone y Carlos, con los que he recorrido este camino y son una profunda fuente de inspiración.

A mis abuelos Elvira (†) y Braulio, y Alejandrina y Maximiliano (†); mis ejemplos a seguir, su capacidad de haber salido adelante ante las adversidades y su amor son de mi gran admiración y los atesoro siempre.

A Gabriela, quién me ha apoyado en todo momento, y con quien comparto mis alegrías y retos. Gracias por todos los momentos juntos y los que nos faltan. Te amo mucho.

Con especial y enorme agradecimiento a la Dra. Claudia Gómez Acevedo, no solo por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme el apoyo para la realización del presente trabajo, si no por cada plática y consejo que me permitió desarrollarme como científico, pero aún más, como persona. Gracias por su amistad, es invaluable.

A los miembros de mi jurado; Dra. Magda Guerra Crespo, Dr. Paul Carillo Mora, Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara, Dra. Raquel Retana Ugalde y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, gracias por cada aporte para enriquecer la tesis, por la ayuda y el gran ejemplo que son para la formación de nuevos investigadores.

A la Dra. Leticia Parra Gámez y la Maestra Jacqueline, por su asesoría, paciencia y gran apoyo para la realización de inmunohistoquímicas, sin ustedes el desarrollo del proyecto no hubiera sido posible.

A mis amigos; Mayra, Lisbeth, Nuria, David, Marco y Abraham. A cada uno de ustedes, gracias por su aportación a este trabajo, las pláticas, discusiones, risas y cada momento que hicieron especial el trabajo en el laboratorio, por su apoyo y amistad que trascienden más allá del ámbito académico. A Juan, Verónica y Guillermo, gracias por su gran amistad y compartir el amor a la docencia y la enseñanza.

A Claudia Cázeres Martínez, por su gran aportación en la inducción de isquemias en el presente trabajo.

A mi familia, a mis amigos, a todos...

“Llega siempre un tiempo en que hay que elegir entre la contemplación y la acción”

-Albert Camus

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	i
2. RESUMEN	1
2.2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Irrigación sanguínea en el cerebro.....	3
3.2. Enfermedad vascular cerebral	4
3.3. Isquemia cerebral.....	6
3.3.1. Núcleo isquémico	8
3.3.2. Zona de penumbra	8
3.4. Patofisiología de la isquemia cerebral.....	9
3.4.1. Acidosis láctica	9
3.4.2. Falla energética y despolarización anóxica	9
3.4.3. Calcio y excitotoxicidad.....	10
3.4.4. Estrés oxidante	10
3.4.5. Neuroinflamación.....	11
3.5. Consecuencias de la isquemia cerebral.....	12
3.6. Neuroprotección en la isquemia cerebral y tratamientos	14
3.7. Modelos de isquemia	14
3.7.1. Isquemia global.....	15
3.7.2. Isquemia focal.....	15
3.8. Sección secuencial de arterias carótidas comunes.....	16
3.8.1. Alteraciones inducidas por SSACC	17
3.9. Memoria	19
3.10. Neurogénesis	20
3.10.1. Neurogénesis en hipocampo	21
3.11. Dexrazoxano	22
3.12. Ácido α -lipoico.....	23
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25

5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVO GENERAL	27
6.1. Objetivos particulares.....	27
7. METODOLOGÍA	28
7.1. Animales	28
7.2. Diseño experimental	28
7.3. Procedimiento quirúrgico.....	29
7.4. Supervivencia.....	30
7.5. Laberinto acuático en Y	31
7.6. Técnica de inmunohistoquímica.....	33
7.7. Cuantificación de células positivas a BrdU y DCX	33
7.7.1. Análisis del marcaje por región hipocámpal.....	34
7.8. Análisis estadístico.....	35
8. RESULTADOS	36
8.1. Supervivencia.....	36
8.2. Laberinto acuático en Y	38
8.3. Neurogénesis	41
8.3.1. Proliferación celular	41
8.3.2. Diferenciación neuronal	43
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	54
11. PERSPECTIVAS	55
12. LITERATURA CITADA	56

1. ABREVIATURAS

AL.....	Ácido α -lipoico
BrdU.....	5-bromo-2-desoxiuridina
DCX.....	Doblecortina
DEX.....	Dexrazoxano
ERO.....	Especies reactivas de oxígeno
EVC.....	Enfermedad vascular cerebral
GD.....	Giro dentado
LAY.....	Laberinto acuático en Y
SSACC.....	Sección secuencial de arterias carótidas comunes

2. Resumen

Introducción: Las enfermedades vasculares cerebrales son consideradas una de las principales causas de muerte en la población adulta a nivel mundial, siendo la más frecuente la isquemia cerebral. Después de un evento isquémico los pacientes presentan alteraciones motoras y cognitivas, sin embargo, no existen estrategias terapéuticas que aminoren estas consecuencias. Hemos reportado que la sección secuencial de arterias carótidas comunes (SSACC) en ratones es un buen modelo de isquemia que produce daño neurológico, y que el uso de dexrazoxano, un antioxidante, disminuye significativamente este déficit; no obstante, aún se desconoce el efecto de este modelo en aspectos cognitivos como la memoria y aprendizaje. **Objetivo:** Evaluar el efecto del dexrazoxano en el modelo de isquemia cerebral aguda inducida por SSACC en la memoria a través de la ejecución del laberinto acuático en Y (LAY), así como la neurogénesis hipocampal. **Metodología:** Ratones machos de 32 a 40 semanas de edad fueron utilizados para el presente estudio. Los ratones fueron divididos en 4 grupos; Control, Sham, SSACC (isquémicos) y los isquémicos administrados con dexrazoxano (DEX) a una dosis de 128 mg/kg i.p. Después de cada cirugía se registró la proporción de sobrevivencia cada 24 h durante 3-4 días. Para evaluar memoria, los ratones, previo a las cirugías, fueron entrenados en el LAY; posteriormente, después de cada intervención quirúrgica, fueron colocados en el mismo laberinto cada 24 h de 3-4 días. Los parámetros considerados para medir memoria fueron el tiempo de latencia y el número de errores. Por otro lado, ratones de cada grupo con las mismas condiciones, pero sin realizar el LAY, fueron utilizados para el estudio de la neurogénesis; se les administró BrdU 2 h antes de ser sacrificados, se removió el cerebro y fue usado para análisis inmunohistoquímico contra BrdU y DCX. **Resultados:** los grupos Control y Sham no registraron ninguna muerte durante el experimento, en cambio, los grupos isquémicos sufrieron una reducción significativa en la proporción de sobrevivencia en la segunda cirugía ($P < 0.0001$). Los ratones isquémicos a los que se les administró DEX no presentaron cambios con respecto al Control. En el LAY el grupo isquémico tratado con DEX mostró un deterioro en la realización de la prueba a las 72 h, siendo más elevado el tiempo de latencia de manera significativa con respecto al Control ($P < 0.01$). El análisis de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo reveló que el grupo isquémico no cambió significativamente con respecto al grupo control y tratado con DEX en la proliferación celular y diferenciación neuronal. **Conclusiones:** Este trabajo sugiere que el DEX favorece la sobrevivencia de ratones en nuestro modelo de SSACC, pero podría inhibir la respuesta neurogénica y afectar la memoria.

2.1. Abstract

Introduction: Cerebrovascular diseases are considered one of the leading causes of death in the adult population worldwide; the most frequent is cerebral ischemia. After ischemic event patients develop motor and cognitive disorders, however, there are no therapeutic strategies that lessen these consequences. We previously reported that the sequence section common carotid arteries (SSACC) in mice is a good model of ischemia to reproduce neurological disorders, and dexrazoxane use, an antioxidant, significantly reduces this deficit; however, the effect of this model is unknown in cognitive aspects such as memory and learning. **Objective:** To evaluate the effect of dexrazoxane on the model of acute cerebral ischemia induced by SSACC in the memory through the implementation of water Y-maze (LAY) and neurogenesis in the hippocampus. **Methods:** Male mice of 32-40 weeks of age were used for this study. Mice were divided into 4 groups; Control Sham, SSACC (ischemic) and ischemic with dexrazoxane administered at a dose of 128 mg / kg i.p. (SSACC / DEX). After the first and second surgery survival ratio every 24 h for 3-4 days was recorded. To assess memory, mice were trained to LAY a week before the first surgery, then it was evaluated with the same memory test after each surgery every 24 h for 3-4 days. The parameters taken into account were the latency and number errors. Furthermore, mice of each group with the same conditions, but without performing the LAY, were used to study the neurogenesis; bromodeoxyuridine were administered 2 h before being slaughtered, the brain was removed and used for immunohistochemical analysis. **Results:** Control and Sham groups not recorded deaths during the experiment, however, ischemic groups suffered a significant reduction in the proportion of survival in the second surgery ($P < 0.0001$). Ischemic mice were administered DEX had no significant changes compared to controls. LAY in the ischemic group treated with dexrazoxane showed a deterioration in the performance of the test at 72 h, with higher latency time significantly with respect to controls ($P < 0.01$). The analysis of neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus revealed that the ischemic group did not change significantly compared to the group treated with dexrazoxane in cell proliferation and neuronal differentiation. **Conclusions:** This study suggests that dexrazoxane favors the survival of mice in our model SSACC, but could inhibit the neurogenic response and impair memory.

3. Introducción

3.1. Irrigación sanguínea en el cerebro

Es importante que al sistema nervioso central llegue una gran cantidad de oxígeno y nutrientes para que realice sus funciones de manera adecuada, para ello se cuenta con algunos sistemas de circulación de la sangre que serán detallados a continuación y nos permitirán dimensionar la importancia de estos.

El *sistema carotídeo* consiste en dos arterias llamadas carótidas comunes, que forman las carótidas internas e ingresan al cráneo a nivel de la cuarta vértebra. Estas a su vez se dividen en varias ramas: arteria oftálmica, arteria carotidea anterior, arteria comunicante posterior, arteria cerebral anterior y arteria cerebral media. Este sistema es importante ya que irriga la parte anterior del cerebro, principalmente los núcleos amigdalíneos, hipocampo, cíngulo y giro dentado (Waxman, 2011).

En cambio, el *sistema ventrobásilar* suministra de sangre la parte posterior del cerebro; tálamo fórnix y tectum. Estas arterias se forman a partir de las arterias subclavias; viajan desde la sexta vértebra cervical y entran al cráneo por el agujero occipital. Suben por el bulbo raquídeo y se unen para finalmente formar la arteria basilar (Snell, 2010).

El sistema que permite la unión del sistema carotídeo y ventrobásilar es el denominado *polígono o círculo de Willis*, el cual a partir de sus ramificaciones; arteria carótida interna, cerebral anterior, arteria comunicante anterior, cerebral posterior y comunicante posterior, se encarga de distribuir el aporte sanguíneo de manera directa al tejido cerebral (Waxman, 2011). En la Figura 1 se muestra un esquema representativo del sistema de irrigación en el sistema nervioso central.

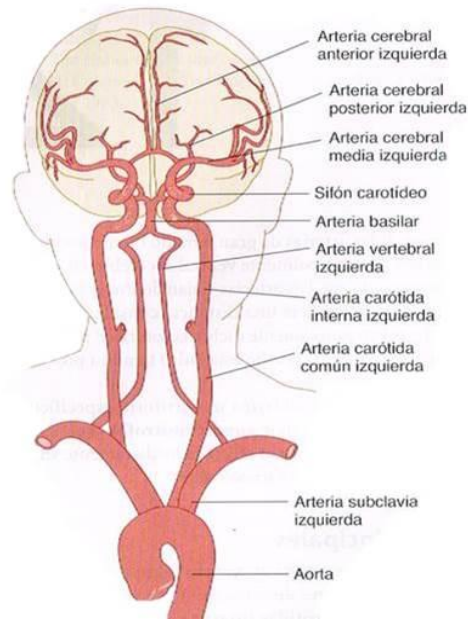


Figura 1. Principales arterias que irrigan el SNC. Tomado de Waxman, 2011.

Sin embargo, el cerebro es susceptible de enfermarse y es en alguno de estos sistemas donde pueden ocurrir alteraciones en el suministro de sangre, lo que desencadenaría una enfermedad vascular cerebral (EVC).

3.2. Enfermedad vascular cerebral

La EVC es definida cómo la interrupción en el suministro del flujo sanguíneo en el tejido cerebral que conduce a un daño isquémico o a una ruptura del vaso sanguíneo lo que condiciona una hemorragia (Figura 2). De acuerdo con la American Stroke Association es una de las primeras causas de ingreso hospitalario a nivel mundial en personas mayores de 20 años (2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS; 2014) apunta que la EVC constituye la tercera causa de muerte y una de las principales causas de discapacidad en la población mayor de 65 años, a nivel mundial.

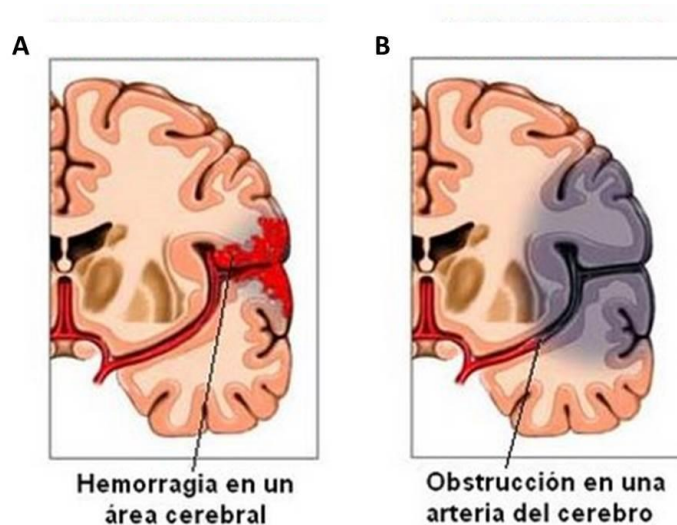


Figura 2. Tipos de EVC. **A.** Esquema representativo de la hemorragia cerebral. Esta ocurre cuando existe una ruptura de una arteria, diseminándolo por todo el tejido cerebral. **B.** Esquema que muestra una isquemia cerebral. La oclusión de una arteria produce la disminución del flujo sanguíneo, reduciendo significativamente la concentración de oxígeno y glucosa. Tomado en <http://www.fisioterapianeurologica.es/patologias/ictus/>.

Los estudios señalan que alrededor de 17.5 millones de personas sufren algún tipo de EVC anualmente, de las cuales mueren alrededor de 5.5 millones (WHO, 2008, 2014) y se espera que en el 2030 la cifra de mortalidad anual aumente a los 8 millones (WHO, 2008; Mackay, 2004). Tomando en cuenta las cifras de incidencia y prevalencia de personas que han sufrido alguna EVC, 12.6 millones de personas quedan con una discapacidad moderada o severa en el mundo (WHO, 2008), siendo las complicaciones más comunes las alteraciones motoras (50-83%), cognitivas (50%), discapacidades en el lenguaje (23-36%) y alteraciones psicológicas (20%) (Paul et al., 2007).

En México la EVC se situaba como la cuarta causa de muerte en adultos (AMEVASC, 2002; Nieto-de Pascual et al., 2003), sin embargo, las investigaciones más recientes indican que esta enfermedad ha pasado a ser la tercera causa de mortalidad. Los datos que muestra la Secretaría de Salud muestran que la EVC ha incrementado a partir del año 2000, la cual refleja que la mortalidad general era de 25,000 muertes anuales, mientras que en el año 2008 aumentó a 30,000

defunciones (Chiquete et al., 2011; 2012). Por otro lado los datos de la (OMS) evidencian que al año, en nuestro país, mueren alrededor 33,000 personas a causa de la EVC (OMS, 2008). En la actualidad no se cuenta con información que sugiera la cantidad de defunciones en los recientes años por este padecimiento.

Además de la mortandad y secuelas que produce la EVC, el costo por persona que implica es alto. Para 1994 se estimó que en México el costo por persona que sufría algún tipo de EVC era de 6,600 a 7,700 dólares (Martínez et al., 1995), lo cual podría haber aumentado en la actualidad. Por lo tanto es importante la búsqueda de tratamientos y reducción de carga económica para esta enfermedad, ya que se prevé que la cantidad de casos de EVC aumente a medida que la población envejece (WHO, 2008).

3.3. Isquemia cerebral

De los casos reportados de EVC, se sabe que alrededor del 87% son de naturaleza isquémica, mientras que la hemorragia intracerebral y subaracnoidea corresponden al 10 y 3%, respectivamente (Lloyd-Jones et al., 2010). Para el presente trabajo nos enfocaremos solo en la isquemia cerebral por ser la más frecuente de las EVC.

El cerebro representa el 2% del peso corporal de un individuo, recibe el 15% del flujo sanguíneo total que proporciona el sistema cardiovascular (aproximadamente de 50-80 mL/100 mg de tejido/1 min), además consume el 25% de glucosa circulante en la sangre y el 20% del oxígeno disponible en el cuerpo, en condiciones basales (Magistretti, 1999; Lapi y Colantuoni, 2015).

Pese a la importancia que representa el flujo sanguíneo para el buen funcionamiento del cerebro, este puede verse comprometido por la oclusión de alguna arteria, produciendo una insuficiencia de oxígeno y glucosa, y ocasionando lo que se conoce como isquemia cerebral (Figura 2B).

Cuando el flujo sanguíneo disminuye de los 20 mL/100mg de tejido/1 min, se considera que ocurre un evento isquémico en el cerebro (Lapi y Colantuoni, 2015), y este puede tener dos orígenes: trombótico, por el desarrollo de un coágulo sobre una placa aterosclerótica reduciendo así el diámetro del vaso sanguíneo, y embólico; por la fragmentación de un trombo formado en otro sitio que viaja por las arterias con menor diámetro hasta obstruir el flujo sanguíneo (Alcalá-Ramírez y González-Guzmán, 2007; Rink y Khanna, 2011).

La isquemia cerebral genera un desbalance en la homeostasis; se ve alterada la circulación de nutrientes dentro del cerebro (glucosa, oxígeno, lípidos, proteínas) y la depuración de residuos, resultando en un falla energética (Rink y Khanna, 2011). Adicionalmente, el daño neuronal ocasionado por la isquemia desarrolla una serie de eventos patofisiológicos; entre los que destacan: excitotoxicidad mediada por glutamato, inflamación que puede inducir incrementos en la concentración de calcio, estrés oxidante, patofisiología vascular y muerte neuronal por apoptosis o necrosis (Moskowitz et al., 2010). Estos serán detallados más adelante.

Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de un evento isquémico son la hipertensión, diabetes, estenosis carotídea asintomática, fibrilación auricular, obesidad, altos niveles de colesterol, aterosclerosis y tabaquismo (Go et al., 2013; Alcalá-Ramírez y González-Guzmán, 2007).

La obstrucción del flujo sanguíneo en la isquemia cerebral perjudica un área particular del cerebro, ocasionado severos daños tisulares, sin embargo esta afectación no es homogénea. Diversos estudios morfofuncionales han descubierto que cuando se da un evento isquémico cerebral, se generan dos regiones en el área dañada, el núcleo isquémico y la penumbra isquémica (Astrup et al., 1981).

3.3.1. Núcleo isquémico

El tejido cerebral que es afectado directamente por la obstrucción de circulación de sangre se le denomina núcleo. En esta región el flujo sanguíneo cae por debajo de los 10 mL/100mg de tejido/1 min, ocasionando una falla energética por la incapacidad de sintetizar más ATP, el agua es compartimentalizada en la células afectadas y se produce un edema citotóxico (El-Koussy et al., 2014). Por lo tanto, al no contar con una irrigación de sangre el tejido cerebral sufre un infarto y daño irreversible lo que ocasiona que muera en cuestión de minutos (del Zoppo et al., 2011).

3.3.2. Zona de penumbra

El área circundante al núcleo isquémico que mantiene un estado de hipoperfusión e hipoxia y que no es lo suficiente para generar un daño irreversible, se le denomina zona de penumbra, y es tejido susceptible de ser rescatado, (Astrup et al., 1981; Paciaroni et al., 2010). El flujo sanguíneo en la penumbra es bajo, pero un poco más elevado que en el núcleo, de 12-20 mL/100mg de tejido/1 min (El-Koussy et al., 2014, del Zoppo et al., 2011). Las células de esta área permanecen viables por un periodo de tiempo limitado debido que las arterias adyacentes suministran nutrientes, aunque estos son en niveles mínimos (Torregrosa et al., 2007). Por lo tanto es importante restablecer el flujo sanguíneo, de lo contrario se da lugar a una serie de procesos celulares y moleculares que son conocidos como cascada isquémica, la cual induce la muerte del tejido promoviendo el crecimiento del núcleo isquémico. Debido a que la penumbra es un tejido potencialmente rescatable, se ha vuelto el blanco de estrategias terapéuticas que permitan una reducción del daño ocasionado por la isquemia y reducción en la muerte que conlleva esta enfermedad (Sutherland et al., 2012).

3.4. Patofisiología de la isquemia cerebral

Cuando la circulación de sangre y nutrientes se ve comprometido por la isquemia cerebral y se pierde la homeostasis en la unidad neurovascular, una serie de procesos celulares ocurren y son denominados *cascada isquémica* (Figura 3). Cada uno de estos procesos será detallado a continuación.

3.4.1. Acidosis láctica

Ante la falta de oxígeno, el piruvato proveniente de la glucólisis es transformado en ácido láctico (lactato) como estrategia para producir energía (Dienel, 2014; Schurr, 2006). Sin embargo, la formación de ácido láctico altera el pH intracelular, acidificándolo en la neurona, lo que puede agravar el daño y fomenta la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) (Rossi et al., 2007).

3.4.2. Falla energética y despolarización anóxica

En la isquemia cerebral, la concentración de oxígeno disminuye rápidamente y por lo tanto se reduce la capacidad de producir más ATP a través de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, lo que ocasiona una falla energética (Xing et al., 2012). El ATP se usa principalmente para mantener el balance iónico entre el interior de la célula y su exterior, regulando principalmente el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a través de canales o bombas dependientes de ATP (Adibhatla y Hatcher, 2008). Cuando la cantidad de ATP no es suficiente para regular estos procesos en la neurona, comienzan a fallar la ATPasa de Na^+/K^+ y la ATPasa de Ca^{2+} , lo que conlleva a una despolarización de la neurona por la incapacidad de recapturar potasio y expulsar sodio, además de una entrada masiva de calcio (Thompson y Ronaldson, 2014). A este evento se le conoce como despolarización anóxica (Torregrosa et al., 2007; Ladecola, 1999).

3.4.3. Calcio y excitotoxicidad

Un aspecto importante durante la isquemia cerebral es que, con la despolarización anóxica, la entrada de iones de Ca^{2+} aumenta su concentración intracelular, lo que permite que las vesículas que almacenan neurotransmisores y que contienen canales dependientes de calcio liberen estos neurotransmisores como el glutamato al espacio presináptico. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador y actúa sobre receptores que estimulan la formación de potenciales de acción a la neurona postsináptica. Los principales receptores por los que actúa el glutamato para provocar esta respuesta son los de tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Ambos receptores son canales permeables a Ca^{2+} , por lo tanto, durante la isquemia, el glutamato sobre estimula la entrada de más calcio a la neurona, lo que ocasiona alteraciones en la homeostasis de este ion, daños internos en la célula y muerte celular, a este proceso se le denomina *excitotoxicidad* (Weilinger et al., 2013; Camacho y Massieu, 2006). Dentro de los daños celulares que se producen posteriormente a la entrada de calcio, se encuentra la activación de enzimas dependientes de calcio, como proteasas, lipasas y endonucleasas, que se encargan de degradar proteínas importantes o lípidos de membrana, lo que compromete la viabilidad celular (Thompson y Ronaldson, 2014; Brassai et al., 2015).

3.4.4. Estrés oxidante

Debido a la alta concentración de calcio y la falla energética durante la cascada isquémica, existe una excesiva fuga de electrones que en contacto con el oxígeno forman especies reactivas del oxígeno (ERO) y radicales libres. Cuando existe un desbalance entre la formación de ERO y los mecanismos que permiten la remoción de estos últimos (cascada antioxidante), se genera un estado llamado estrés oxidativo (Kidd, 2005; Sayre et al., 2008). Una de las ERO que se generan inicialmente es el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que por dismutación es convertido a

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y esta a su vez, en contacto con hierro (Fe^{2+}) lleva a cabo la reacción de Fenton, produciendo el radical hidroxilo (OH^\bullet), uno de los compuestos más reactivos que existen y puede oxidar ADN, proteínas y principalmente lípidos (Hansberg-Torres, 2008; Hall et al., 2010), comprometiendo la viabilidad neuronal. Es importante destacar que durante la isquemia se produce una elevación en la concentración de Fe^{2+} (Minhas et al., 2014), esto se debe particularmente a que el cambio en el pH permite la liberación del hierro de las proteínas a las que se encuentra unido, como la transferrina (Biemond et al., 1988). Y se ha demostrado que esta elevación participa activamente en favorecer la formación del radical hidroxilo y el estrés oxidante por la reacción de Fenton (Selim y Ratan, 2004).

3.4.5. Neuroinflamación

Cuando existe daño por la insuficiencia de sangre en el cerebro y surgen los diferentes mecanismos que describimos anteriormente, el sistema inmune se activa para delimitar el daño, proteger el tejido y células adyacentes, y remover los desechos celulares (Trendelenburg, 2014).

La célula encargada de llevar a cabo esta respuesta inmune es la microglía; que después de un evento isquémico se activa para producir moléculas neurotróficas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Thiel et al., 2014; Lakhan et al., 2009), ambas con propiedades neuroprotectoras. Sin embargo, también puede potenciar la liberación de citosinas pro-inflamatorias como la interleucina- 1β , interleucina-6, factor de necrosis tumoral, ($TNF\alpha$), prostangladina E2, moléculas citotóxicas que promueven la formación de radicales libres y mecanismos de daño celular que afectan al área de penumbra (Thompson y Ronaldson, 2014, Thiel et al., 2014; Lakhan et al., 2009).

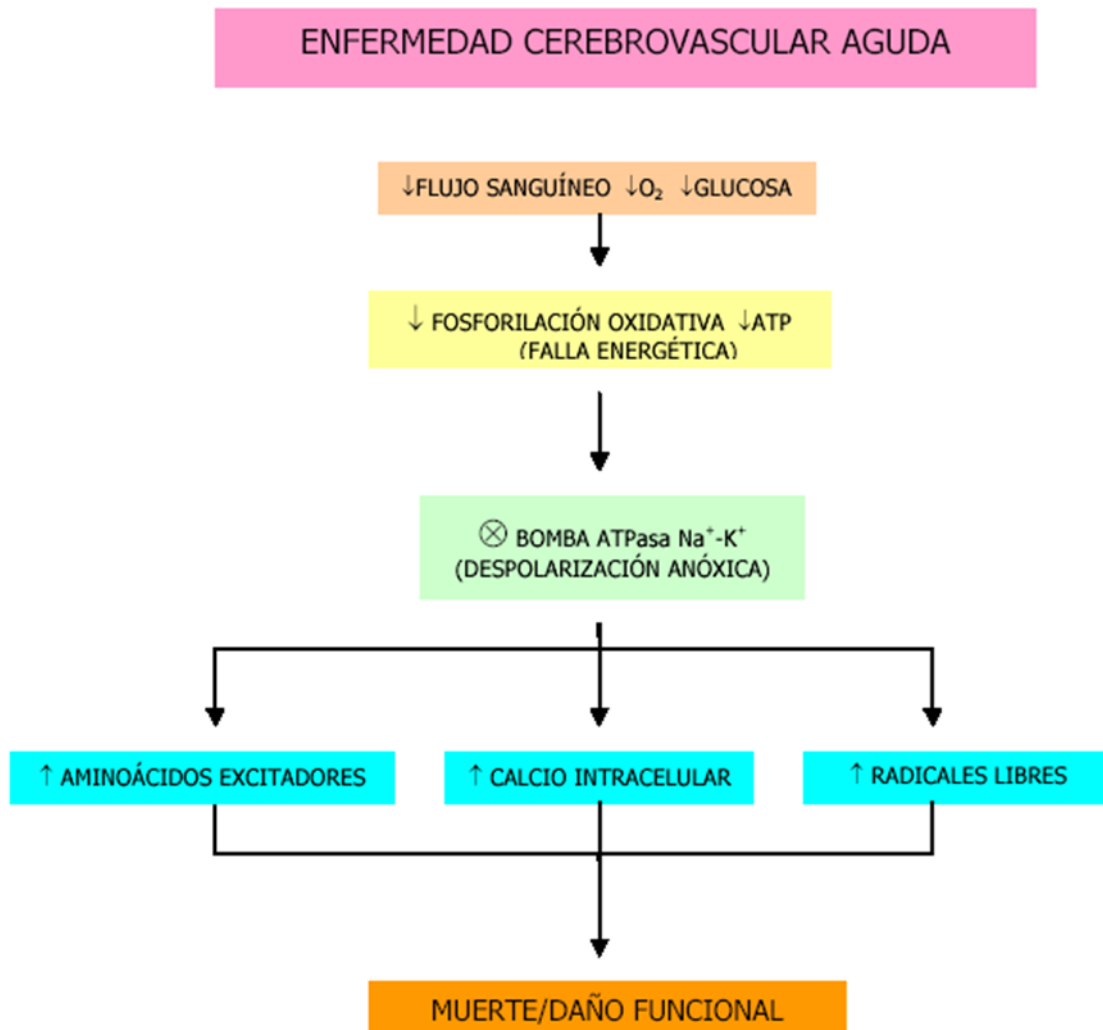


Figura 3. Diagrama que muestra los procesos más relevantes de la cascada isquémica y su relación entre ellas.

3.5. Consecuencias de la isquemia cerebral

El deterioro motor, que causa limitaciones en el movimiento muscular, es la consecuencia ampliamente conocida por el evento isquémico en el cerebro (Langhorne et al., 2009). Sin embargo existen otras consecuencias que no se han analizado de manera extensa, como lo son los trastornos en habla y lenguaje, disfagia, visión, sensación y memoria (Langhorne et al., 2011).

La relevancia de conocer de manera clara el déficit cognitivo causado por la isquemia cerebral es demostrado en el trabajo de Pohjasvaara y colaboradores, donde se evidenció que en una muestra de pacientes isquémicos, el 58.9% de personas entre 55 y 70 años tenían un deterioro cognitivo, mientras que en personas de 71 a 84 años la cifra aumentaba a 69.7% (Pohjasvaara et al., 1997). Además de este detrimento cognitivo en pacientes con isquemia, el cual se ve aumentado por la edad, se ha visto que también hay un ascenso en el porcentaje de pacientes con demencia (Pohjasvaara et al., 1997b).

Rockwood y colaboradores realizaron un estudio en ancianos de 65 a 84 años de edad con alteraciones cognitivas por accidentes cerebrovasculares, demostrando que el deterioro cognitivo más frecuente dentro de estos pacientes fue un déficit cognitivo vascular comparable al nivel de la demencia, y que estos tenían una tasa de mortalidad más grande que los pacientes que no sufrían demencia (Rockwood et al., 2000). Es importante considerar que en estos estudios las pruebas empleadas para considerar alteraciones cognitivas toman en cuenta la habilidad en memoria (verbal o visual), orientación, habilidad del lenguaje, atención y razonamiento abstracto.

La caracterización de los dominios o funciones cognitivas alteradas como índice de daño por isquemia se remontan a los estudios de Tatemichi y colaboradores, en el cual se proponía que los procesos cognitivos alterados eran la memoria, orientación, lenguaje y funciones de atención (Tatemichi et al., 1994). Actualmente se han propuesto la existencia de diez dominios entre los que figuran lenguaje, lectura y escritura, numérico/cálculo, praxis de extremidades, función visoespacial, uso social del lenguaje, función emocional, atención, función ejecutiva y memoria (Donovan et al., 2008); siendo esta última un proceso alterado muy importante, ya que puede preceder a la demencia y afecta la calidad de vida del paciente.

3.6. Neuroprotección en la isquemia cerebral y tratamientos

Para los eventos de isquemia cerebral no existe un tratamiento de uso clínico que proteja el tejido afectado por la ausencia de oxígeno y nutrientes. Hasta ahora los únicos tratamientos que se utilizan en la clínica son para restaurar el flujo sanguíneo por medio de trombólisis y terapia antiplaquetaria, siendo la primera la más ampliamente usada. El activador tisular del plasminógeno (rt-PA, por sus siglas en inglés), es el único tratamiento aprobado por la FDA para eventos de isquemia cerebral aguda y ha demostrado reducir el daño cerebral y la discapacidad en los pacientes que padecen esta enfermedad (Thompson y Ronaldson, 2014). Su mecanismo de acción consiste en disolver los coágulos para restablecer el flujo de sangre y oxígeno. Sin embargo, la ventana terapéutica del rt-PA es de solo 4.5 horas después de los primeros síntomas (Lakhan et al., 2009). Aunque se han probado alrededor de 1000 agentes potencialmente neuroprotectores en estudios básicos, desafortunadamente ninguno de estos ha tenido éxito al trasladarse a la clínica (Suntherland et al., 2012).

No obstante, ante la falta de éxito de los fármacos o tratamientos en la clínica, es importante buscar nuevas estrategias terapéuticas que tengan un mayor potencial de éxito y modelos de isquemia cerebral que nos permitan entender sus mecanismos de acción.

3.7. Modelos de isquemia

El uso de modelos animales para el estudio de las enfermedades cerebrovasculares, ha permitido entender la etiología de los diferentes subtipos de este padecimiento, así como la búsqueda de estrategias terapéuticas que permitan aminorar sus graves consecuencias. Dentro de los modelos inductores de isquemia cerebral encontramos dos tipos; los modelos de isquemia focal y

global (Krafft et al., 2012). Cabe destacar que los animales que son usados para estos modelos son principalmente roedores.

3.7.1. Modelos de isquemia global

La isquemia puede ser inducida por dos modelos muy conocidos, la oclusión temporal de las arterias carótidas o vertebrales, llamado modelo de oclusión de 2 vasos (Pulsinelli y Brierley, 1979; Krafft et al., 2012) o también por la oclusión permanente de las arterias vertebrales y ligadura temporal de las carótidas, denominado modelo de oclusión de 4 vasos (Schmidt-Kastner et al., 1989; Tajiri et al., 2013). Ambos métodos reproducen el efecto después de un paro cardiaco e inducen daño bilateral en todo el cerebro con la misma intensidad (McBean y Kelly, 1998; Krafft et al., 2012). Tienen la ventaja de que el procedimiento quirúrgico es simple y rápido, además de que la tasa de inducción de isquemia es alta (Rosell, 2005). Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado otro modelo de isquemia global; la sección secuencial de arterias carótidas comunes (Rodríguez et al., 2000), sin embargo este será detallado más adelante.

3.7.2. Modelos de isquemia focal

De acuerdo a lo que ocurre en la mayoría de eventos isquémicos en humanos, el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) reproduce la obstrucción de esta en los animales de manera permanente o temporal con reperfusión (Tamura 1981; Fluri et al., 2015). El procedimiento consiste en la oclusión mecánica de la arteria a través de dispositivos como clips o ligaduras (Macrae, 2011), aunque también puede ser por medio de electrocoagulación o por trombosis fotoquímica (Rosell, 2005) y no existe alguna intervención masiva como craneotomías, lo que evita el daño a otras estructuras craneales (Fluri et al., 2015).

3.8. Sección secuencial de arterias carótidas comunes

En el laboratorio se ha desarrollado un nuevo modelo de isquemia global, la sección secuencial de arterias carótidas comunes (SSACC). Este modelo tiene ciertas ventajas ya que emplea ratones adultos (8-10 meses) y por lo tanto más susceptibles al daño isquémico (Fuentes-Vargas et al., 2002); puesto que la mayoría de modelos de isquemia cerebral usa ratones jóvenes, su recuperación suele ser mayor y más rápida, sin embargo esto no sucede en los pacientes clínicos, que se encuentran en su mayoría en una edad mayor a 65 años (Rodríguez et al., 2000; OMS, 2014).

El método consiste en la oclusión permanente de la arteria carótida izquierda, y 32 días después de la derecha (Rodríguez et al., 2000) (Figura 4). El intervalo de 32 días entre la oclusión de las arterias carótidas comunes hace posible generar un estado de perfusión crónicamente reducida antes de la segunda ligadura, para así lograr animales que presenten eventos isquémicos previos tal y como ocurre en pacientes con ECV transitoria (ataques isquémicos transitorios). Se ha observado que a consecuencia de la oclusión de la primera carótida aumenta el diámetro de la carótida contralateral, de las arterias que constituyen el círculo de Willis y se generan nuevos vasos sanguíneos (Rodríguez et al., 2000). Estos datos concuerdan con el fenómeno de tolerancia isquémica reportado en diversos trabajos, donde la disminución del flujo cerebral se acompaña de una serie de respuestas que preparan al cerebro a resistir en un evento posterior.

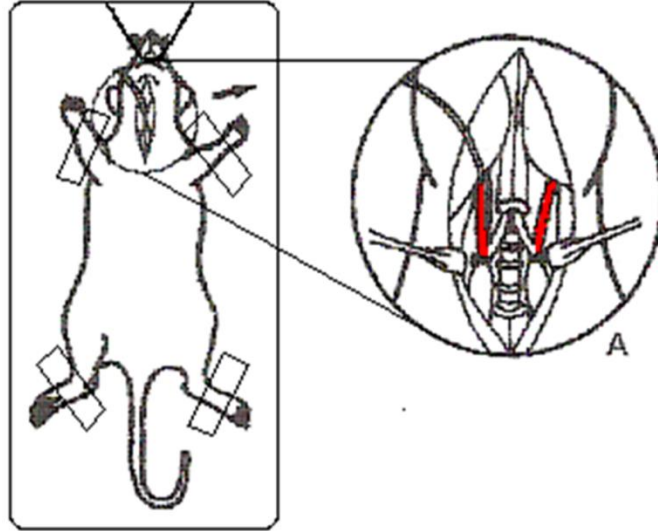


Figura 4. Esquema que ejemplifica la incisión para exponer las carótidas comunes y su posterior corte.

3.8.1. Alteraciones inducidas por SSACC

El modelo de isquemia por SSACC ha reportado un síndrome isquémico de 10 alteraciones consistentes y bien definidas: incoordinación motora, posición corporal anormal (lateralizada), hipomotilidad, disminución del tono y la fuerza muscular, temblor, encorvamiento, flexión de la extremidad anterior y marcha atáxica (Rodríguez et al., 2003). A diferencia de otros modelos de isquemia, el modelo de SSACC induce una gran cantidad de alteraciones neuroconductuales que ofrecen la oportunidad de evaluar el impacto funcional de la isquemia cerebral aguda y su posible recuperación después de la administración de fármacos neuroprotectores (Rodríguez et al., 2000b; 2003). En este sentido, la primera alteración que fue caracterizada de manera más específica fue la actividad locomotora; los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de esta, tanto exploratoria como espontánea de los animales isquémicos, comparados con los animales control (Santiago-Mejía et al., 2004). Posteriormente, se estudió el efecto de la isquemia cerebral aguda sobre la sensibilidad táctil de los ratones, colocando un trozo de cinta adhesiva en la

superficie plantar de una de las extremidades delanteras. Se encontró que la isquemia cerebral aguda inducida por SSACC aumenta significativamente el tiempo requerido por el roedor para retirar la cinta adhesiva, lo cual sugiere que la sensibilidad táctil de los ratones isquémicos está disminuida (Gómez, et al., 2005). Considerando que la incoordinación motora y la parálisis de la extremidad anterior son dos de las alteraciones más comunes y persistentes en la isquemia producida por SSACC, se procedió a evaluar la capacidad de los animales isquémicos para manipular, abrir y consumir una semilla de girasol. Los resultados obtenidos señalaron que los animales isquémicos presentan alteraciones motoras finas (manos y dedos) que les impiden sostener y manipular la semilla de girasol (Gómez et al., 2006).

Por otro lado, los estudios histopatológicos de los animales sometidos al corte secuencial de las arterias carótidas comunes, señala que el daño cerebral se presenta en ambos hemisferios, no obstante es en el derecho donde se presenta de forma más marcada. Las áreas de infarto corresponden a la corteza frontoparietal, estriado e hipocampo en las capas CA1, CA2, CA3 Y CA4 (Rodríguez et al., 2000).

El uso de fármacos como el dexrazoxano y el ácido α -lipoico han mostrado disminuir las alteraciones ocasionadas por el modelo de SSACC, principalmente en la tasa de mortalidad y alteraciones motoras (Rodríguez et al., 2003; Santiago-Mejía et al., 2004). Las propiedades del primer fármaco, que es el de nuestro interés, se detallarán más adelante.

Sin embargo, las alteraciones cognitivas no han sido descritas y caracterizadas en este modelo, particularmente sobre memoria, una condición que es afectada por la isquemia como se describió anteriormente.

3.9. Memoria

La memoria es una red de funciones interrelacionadas que manejan una gran cantidad de información, y debido a esta complejidad no se puede hablar de un simple proceso, sino de un sistema completo. Por lo tanto podemos definir a este sistema como la función del cerebro que tiene como propósito clasificar, codificar, guardar y recuperar una amplia diversidad de información relevante para un determinado sujeto (Carrillo-Mora et al., 2009).

En términos generales, la memoria puede ser clasificada en dos grupos: la memoria declarativa, referente a la información que es convencionalmente transmitida o expresada (Purves et al., 2004; Carrillo Mora et al, 2009); y la memoria procedimental (no declarativa), que es referente a la información motora o habilidades de percepción que no son transmitidas de manera oral (Purves et al., 2004; Carrillo-Mora et al., 2009).

Para este estudio hablaremos de la memoria espacial, que no se puede clasificar dentro de alguno de estos grupos, ya que puede tomar características de ambas. La memoria espacial es definida como la función cerebral responsable por reconocer, codificar, guardar y recuperar la información espacial de la disposición de los objetos o rutas específicas (Kessels et al., 2001). Una de las regiones más importantes que ha sido asociado con la memoria espacial es el hipocampo (Squire et al., 2008). Para evaluar la memoria espacial en modelos de animales se han desarrollado dispositivos conocidos como laberintos, entre los que destacan el laberinto radial, el laberinto acuático, el laberinto en “Y” y “T” (Carillo-Mora et al., 2009).

En años recientes se ha planteado que los procesos de memoria, como la espacial, pueden ser modificadas por la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto (neurogénesis).

3.10. Neurogénesis

En el campo de las neurociencias se estableció como dogma que la formación de nuevas neuronas, o neurogénesis, se limitaba solo al desarrollo embrionario y posnatal; sin embargo, con el tiempo, esta idea ha cambiado y sabemos que las neuronas no se regeneran, pero existen ciertas áreas en el cerebro en las que se pueden formar nuevas neuronas. De los primeros estudios que sugirieron la posibilidad de la existencia de neurogénesis son los que realizó Ezra Allen, donde mostró figuras de células mitóticas en la pared de los ventrículos laterales en ratas albinas de 3 meses de edad (Allen, 1912). Sin embargo, este trabajo no se tomó en cuenta y tuvieron que pasar décadas para que se planteara nuevamente que la neurogénesis podía llevarse a cabo en individuos adultos. En los años 60's, Joseph Altman y colaboradores hallaron que las ratas que recibieron timidina tritiada, un nucleósido que se incorpora a células en división mitótica, mostraban marcaje en células del giro dentado (Altman 1963; Altman y Das, 1965b), en la zona subventricular de los ventrículos laterales (Altman y Das, 1965a) y evidenciaron la migración de estas nuevas células hasta el bulbo olfatorio (Altman, 1969). Posteriormente Kaplan corroboró estos resultados, al encontrar células con el marcaje de timidina tritiada en células del hipocampo y bulbo olfatorio usando un microscopio electrónico. Se sabe que el proceso de formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto ocurre en roedores (Cameron et al., 1993), monos (Gould et al., 1999) y humanos (Eriksson et al., 1998; Sanai et al., 2004; Curtis et al., 2011). Y está bien establecido y aceptado que las regiones en las que ocurre de manera constitutiva la neurogénesis son el giro dentado (GD) del hipocampo y el bulbo olfatorio. Además se ha sugerido que la neurogénesis hipocampal tiene un papel importante dentro de los procesos de memoria y aprendizaje (van Praag et al., 2000), principalmente sobre la memoria episódica y el proceso de separación de patrones (Sahay et al., 2011), memoria espacial (Zhang et al., 2015; Yang et al., 2015; Tronel et al., 2015; Dupret et al., 2008) y como "amortiguador" de la respuesta al estrés (Surget et al., 2011; Snyder et al., 2011). La formación de nuevas neuronas depende de la presencia de células multipotenciales. En el

hipocampo las células multipotenciales residen en la zona subgranular del giro dentado (Kempermann et al., 2004; Zhao et al., 2008).

3.10.1. *Neurogénesis en hipocampo*

En el hipocampo, el proceso neurogénico ocurre en la zona subgranular del GD, donde residen células multipotenciales y progenitoras que formarán nuevas neuronas (Kempermann et al., 2004). Este proceso puede dividirse en cuatro etapas; fase de proliferación y amplificación de células progenitoras, fase de sobrevivencia temprana, fase de maduración o diferenciación y una fase de sobrevivencia tardía (Kempermann et al., 2004; Kempermann, 2015). Las células en fase de proliferación pueden ser identificadas por el uso de 5-bromo-2-desoxiuridina, un análogo de la timidina que se incorpora al ADN en fase de replicación y puede ser detectado con anticuerpos específicos (Landgren y Curtis, 2011), mientras que para la fase de diferenciación y maduración es utilizado el marcaje por anticuerpos contra doblecortina (DCX) (von Bohlen Und Halbach, 2007; Encinas et al., 2013), una proteína asociada a microtúbulos y que participa activamente en la migración neuronal (Weimer y Anton, 2006).

Se ha demostrado que la neurogénesis en el hipocampo puede ser regulada de manera positiva por neurotrofinas, ambiente enriquecido, ejercicio, antioxidantes, antidepresivos y neurotransmisores (Rolando y Taylor et al., 2014; Ramírez-Rodríguez et al., 2011; Vukovic et al., 2011; Ming y Song, 2011). Por el contrario, también puede ser regulada de manera negativa por altos niveles de glucocorticoides, depresión, estrés oxidante y envejecimiento (Couillard-Després, 2013; Snyder et al., 2011; Vukovic et al., 2011, Surget et al., 2011).

Durante la isquemia se ha observado que la neurogénesis puede aumentar en el GD del hipocampo, principalmente en los modelos de isquemia focal (Sun et al., 2015; Manzanero et al., 2014; Fan et al., 2014; Spaccapelo et al., 2013; Quintard et al., 2011; Wang et al., 2011). Sin embargo, aún no se ha establecido de manera

determinante si esta activación tiene un rol en la recuperación de funciones deterioradas por el evento isquémico.

Esto nos lleva a plantear la posibilidad de que efecto tiene el modelo de isquemia sobre neurogénesis y si alguna modificación en este proceso tendría repercusiones sobre la memoria.

3.11. **Dexrazoxano**

El dexrazoxano (ICRF-187) es un fármaco de la familia de los bisdioxopiperazinas que han demostrado ser un inhibidor catalítico de la topoisomerasa II α sin provocar alteraciones en el ADN (Jensen et al., 2000; Bakhhet et al., 2011). La constitución química del dexrazoxano consiste en dos anillos solubles en agua (Figura 5), que al hidrolizarse por acción de la enzima dihidropirimidina amidohidrolasa, se abren quedando en una conformación análoga al ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) conocida como ADR-95 (Wiseman y Spencer, 1998; Langer, 2014). Como parte de la familia de las bisdioxopiperazinas, el efecto antineoplásico por inhibición de la topoisomerasa II α del dexrazoxano se ha documentado (Hasinoff et al., 2001; Vavrova et al., 2013; Deng et al., 2014; Deng et al., 2015). Sin embargo, la mayoría de investigaciones evidencian su capacidad como quelante del hierro y prevenir la cardiotoxicidad inducida por fármacos para tratar el cáncer como las antraciclinas (Sun et al., 2015; Aryal et al., 2014; Roti-Roti y Salih, 2012; Popelová et al., 2009; Imondi et al., 1996; Malisza y Hasinoff, 1996; Seifert et al., 1994). Se sugiere, a manera de hipótesis, que las antraciclinas provocan cardiotoxicidad por la reducción de estas en forma de radicales de semiquinona como metabolitos, los cuales, en presencia de oxígeno favorecen la formación del anión superóxido y subsecuentemente el radical hidroxilo por la reacción de Fenton (Rao, 2013; Štěřba et al., 2012). Sin embargo, se ha propuesto otro mecanismo que explica la cardiotoxicidad. Este consiste en la formación de complejos entre el hierro y las antraciclinas, produciendo ion ferroso que al reaccionar con el oxígeno forma anión superóxido (Štěřba et al., 2013; Rao,

2013; Šimůnek et al., 2009). Como se mencionó anteriormente, el anión superóxido es una ERO que puede formar al radical hidroxilo y generar el estrés oxidante, comprometiendo la viabilidad de las células. Por otro lado, como podemos apreciar, el hierro participa de manera importante en la reacción de fenton y sus iones propician la formación de ERO, siendo este mecanismo donde el dexrazoxano adquiere un papel importante, pues al participar como quelante de hierro evita los procesos mencionados anteriormente.

Adicionalmente, trabajos recientes han mostrado que el dexrazoxano tiene actividad como “scavenger” del anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito en experimentos *in vitro* (Zhang et al., 2010; Galetta et al., 2010) e *in vivo* (Galetta et al., 2010), sugiriendo que puede tener intrínsecamente la capacidad de ser antioxidante. En el modelo de isquemia de SSACC la administración de dexrazoxano ha evidenciado tener efectos neuroprotectores excepcionales (Rodríguez et al., 2003). No obstante, su rol sobre alteraciones cognitivas después de la isquemia cerebral no ha sido evaluada.

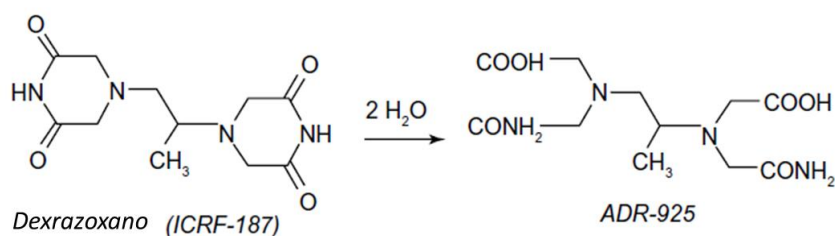


Figura 5. Estructura química del dexrazoxano en su condición normal e hidrolizada. Modificado de Langer, 2014.

3.12. Ácido α -lipoico.

Esta molécula es una agente catalítico para la conversión de piruvato a α -cetoglutarato (Park et al, 2014) y ha demostrado ser un buen antioxidante al reducir el daño por lipoperoxidación y aumentar la actividad de enzimas antioxidantes en diferentes modelos animales (Veskovic et al., 2015; Dwivedi et al., 2014; Hardas et al., 2013; Muthuswamy et al., 2006; Shila et al., 2005;

Arivazhagan et al., 2002). En el modelo de SSACC, ha mostrado reducir la tasa de mortalidad en ratones (Santiago-Mejía, 2005). Debido a estos efectos, decidimos incorporar un grupo de animales isquémicos con AL como control positivo para compararlos con los animales que recibieron dexrazoxano.

4. Planteamiento del problema

La EVC es una de las primeras causas de ingreso hospitalario y de mortalidad en la población adulta de acuerdo con la American Stroke Association (2008); además, un 25% de los pacientes con EVC aguda mueren en el primer mes, y un 50% de los sobrevivientes quedan física y/o mentalmente discapacitados. También se conoce que los tratamientos hasta ahora establecidos presentan efectos secundarios y que los fármacos capaces de reducir el efecto del infarto cerebral isquémico, en modelos animales, carecen de eficacia clínica. El uso de modelos animales ha demostrado ser una herramienta en el establecimiento de la fisiopatología involucrada en la isquemia e infarto cerebral, pero no existe aún un modelo que nos permita identificar el efecto neuroprotector a nivel funcional. En este sentido el modelo de SSACC utilizado en este trabajo presenta ventajas, como el uso de animales envejecidos y la inducción de un estado de hipoperfusión crónica antes del evento de isquemia aguda, lo que nos permitiría valorar la utilidad de estrategias terapéuticas como fármacos neuroprotectores para su posterior uso a nivel clínico.

Por tal motivo proponemos caracterizar las alteraciones cognitivas en el aprendizaje y memoria inducidas por el corte secuencial de las arterias carótidas comunes en ratones utilizando un modelo de conducta de nado (laberinto acuático en Y) y su posible modificación por fármacos neuroprotectores, específicamente el dexrazoxano.

También consideramos importante estudiar la relación entre este déficit neurológico con el daño morfológico a nivel de la proliferación y diferenciación de nuevas neuronas en el GD del hipocampo, en ratones sometidos a la SSACC.

5. Hipótesis

La isquemia cerebral causada por el modelo de SSACC producirá alteraciones en la memoria de ratones y modificará el proceso neurogénico en el GD del hipocampo. Por otro lado, la administración de dexrazoxano revertirá las alteraciones cognitivas en la memoria inducidas por la isquemia. Así mismo, esperamos que el dexrazoxano tenga efectos en la proliferación de nuevas células y diferenciación neuronal en el GD del hipocampo.

6. Objetivo general

Evaluar el efecto del dexrazoxano en el modelo de isquemia cerebral aguda inducida por SSACC, sobre el proceso de memoria en un modelo de conducta de nado. Así como su efecto sobre la proliferación y diferenciación de nuevas neuronas en el GD del hipocampo.

6.1. Objetivos particulares

- Identificar si la memoria se ve afectada en el modelo de isquemia de SSACC en ratones a través de un modelo de conducta de nado.
- Determinar la proliferación celular en el GD de hipocampo.
- Evaluar el efecto del modelo de SSACC en la diferenciación de nuevas neuronas en el GD del hipocampo a través de cuantificar la expresión de la proteína doblecortina (DCX), un marcador de neuroblastos y neuronas jóvenes.
- Evaluar el efecto del dexrazoxano, sobre los posibles cambios en memoria y neurogénesis inducidas por SSACC.
- Comparar los efectos del dexrazoxano con otro fármaco antioxidante como control positivo (ácido α -lipoico), en las pruebas de memoria en ratones control e isquémicos.

7. Metodología

7.1. Animales

Para el presente estudio se emplearon ratones machos envejecidos de 8-10 meses de edad, de la cepa CFW (Taconic Farms, Germatown, NY), obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales fueron colocados en cajas con 5 ratones cada una, en un cuarto de temperatura controlada ($22\pm^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $55\pm 3\%$), con un ciclo de luz-oscuridad controlado (luz de 8 a.m. a 8 p.m.) y con acceso a agua y alimento *ad libitum* (Purina chow, México, Ciudad de México). Los animales se aclimataron a las condiciones del cuarto por lo menos una semana. Todos los experimentos se realizaron conforme a la ética experimental establecida en el Reglamento de la Ley General en Materia de Investigación para la Salud de México (NOM 062-ZOO-1999: Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de Animales de Laboratorio), Secretaría de Salud, 1999.

7.2. Diseño experimental

Inicialmente, los ratones fueron divididos en tres grupos; Control, Sham y SSACC (isquémicos). Antes de realizar la primera cirugía, los ratones realizaron durante 5 días la prueba de laberinto acuático en Y (LAY), una sola vez por día. Las primeras 4 sesiones fueron consideradas como periodo de entrenamiento. En el quinto día se registró la conducta como línea base para conocer los parámetros antes de la sección de cada carótida. A las 24, 48 y 72 horas de la primera intervención quirúrgica, los ratones fueron nuevamente colocados en el laberinto acuático para observar la posible existencia de alteraciones en la memoria. Posteriormente, las pruebas de nado fueron evaluadas una vez a la semana, hasta la segunda cirugía (día 34). La segunda línea base fue evaluada antes de la segunda sección de la arteria carótida y nuevamente, a las 24, 48, 72 y 96 horas después de esta última (Figura 6). La administración del dexrazoxano (128 mg/kg) se realizó al grupo de ratones isquémicos 15 minutos después de la segunda

sección, derivando un cuarto grupo de ratones (SSACC/DEX). También se consideraron dos grupos más, un grupo control que recibiera la misma dosis del fármaco (DEX) pero sin isquemia y uno al que le fue administrado ácido α -lipoico (100 mg/kg) a ratones isquémicos (SSACC/AL); esto con la finalidad de tener un grupo de control positivo, pues como mencionamos con anterioridad, el uso de esta molécula en nuestro modelo de isquemia ha mostrado resultados favorables al disminuir la tasa de mortalidad y el déficit neurológico (Santiago-Mejía et al., 2004; Santiago-Mejía, 2005).

Por otro lado, un lote de ratones que no estuvieron expuestos a las pruebas conductuales pero si a las cirugías, recibieron BrdU a las 48 horas después de la inducción de la isquemia a una dosis de 50 mg/kg i.p., dos horas antes de ser sacrificados. El sacrificio consistió en administrar una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg) y posteriormente una perfusión intracardial con solución salina (0.9%), seguido de paraformaldehído (4% en una solución 0.05 M de PBS). El cerebro fue rápidamente removido, guardado en paraformaldehído por 3 días y transferidos a una solución de sacarosa al 30% a 4°C hasta su uso.

7.3. Procedimiento quirúrgico

La cirugía de todos los animales se desarrolló entre las 9:00 y las 15:00 horas. El procedimiento de SSACC fue llevado a cabo de acuerdo a lo previamente reportado (Rodríguez et al., 2000). Brevemente, el procedimiento quirúrgico consistió en anestésiar a los ratones con 5 ml de éter (99.9%) en un recipiente hermético de vidrio hasta quedar adormecidos. Para verificar que los ratones quedaron lo suficientemente anestesiados, se verificó la pérdida de tono muscular e hiposensibilidad. Posteriormente se procedió a realizar una pequeña incisión en la cara anterior del cuello donde se separó la arteria carótida izquierda del nervio vago y se seccionó entre dos ligaduras, para posteriormente suturar la incisión con hilo quirúrgico. Una vez terminada la cirugía, los animales fueron colocados en un área de recuperación corporal con una lámpara incandescente. 34 días después se procedió a realizar el mismo procedimiento para la sección de la arteria carótida

derecha. Cabe mencionar que los grupos Control no fueron sometidos a cirugía ni anestesia, mientras que el grupo Sham fue sometido a las mismas condiciones que los intervenidos quirúrgicamente, pero no se ligaron ni cortaron las carótidas.

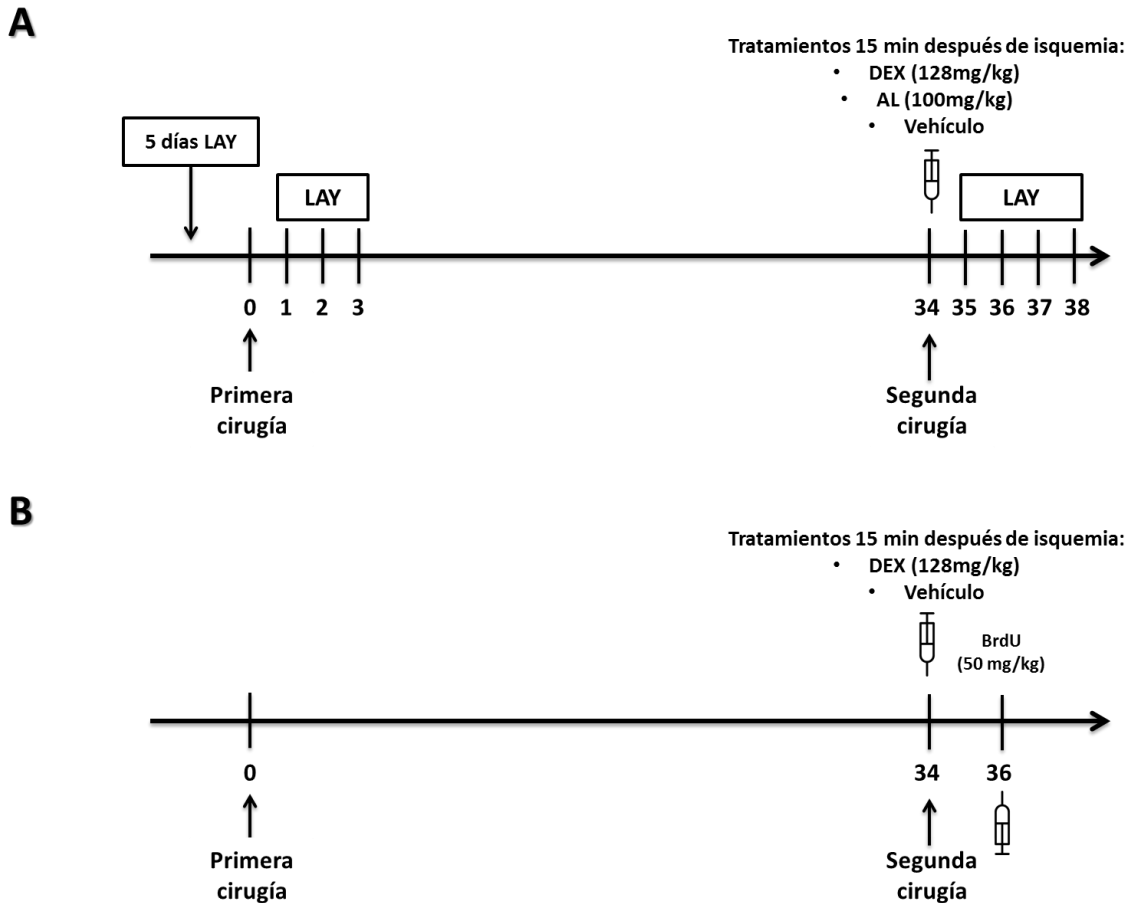


Figura 6. Tren cronológico del diseño experimental. **A.** Esquema de los experimentos para la evaluación de memoria en el LAY en los diferentes grupos de ratones. **B.** Tren de los procedimientos para el análisis del efecto del modelo de isquemia sobre la neurogénesis en GD del hipocampo.

7.4. *Sobrevivencia*

El registro de la proporción de sobrevivencia fue registrado en todos los grupos a las 24, 48, 72 y 96 horas después de cada cirugía.

7.5. *Laberinto acuático en Y (LAY)*

El paradigma para evaluar el aprendizaje y la memoria es una adaptación del modelo descrito por Morris (1984), el cual es ampliamente utilizado para el estudio de alteraciones de funciones cognitivas y efectos de daño cerebral. Para el presente estudio se empleó una piscina en forma de Y de acrílico transparente, con las siguientes dimensiones: 17 x 25 x 74 cm (Figura 7). El laberinto fue colocado en un cuarto en condiciones de luz amarilla de baja intensidad. La plataforma empleada para las pruebas fue de polietileno color negro y circular de 9 cm de diámetro x 9.5 cm de alto. El nivel del agua en la piscina se mantuvo ligeramente por encima del nivel de la plataforma a una temperatura de 20° C. Es importante mencionar que a diferencia del paradigma de Morris, el agua no fue teñida, ya que dificultaría la observación del comportamiento del roedor.

Para la prueba de nado, el laberinto fue puesto sobre una mesa de color negro recubierta alrededor por cartulina del mismo color para obstaculizar el encuentro de la plataforma por parte del ratón. Además se encendió un ventilador que funcionará como ruido blanco. Entonces los animales, de manera individual, fueron colocados gentilmente en el brazo de inicio y el tiempo límite para encontrar la plataforma fue establecido en 90 segundos. Si el ratón no lograba encontrar la plataforma, era colocado en esta por el propio observador y se le permitía estar ahí por 10 segundos. A través de un software de grabación de video (OASPADVid OMNIALVA™) se registró la conducta que presentaron los ratones para determinar la latencia de escape y número de errores (las veces que el animal entraba al brazo equivocado), parámetros seleccionados para determinar la presencia de alteraciones cognitivas.

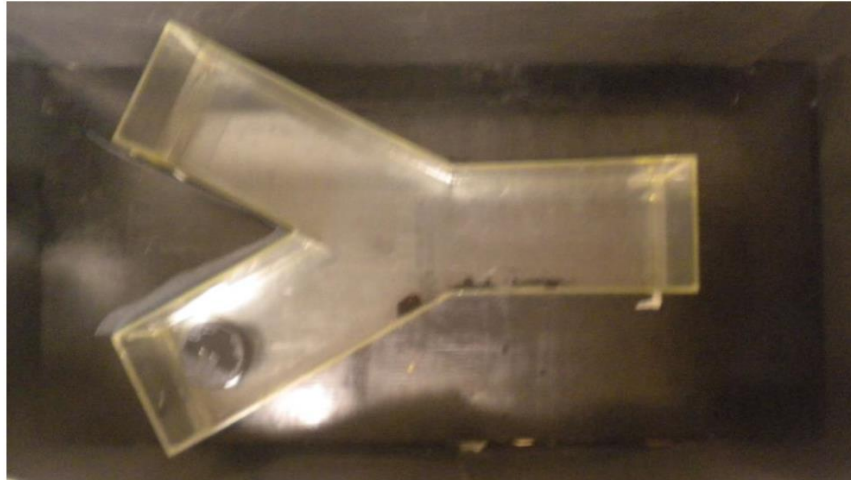


Figura 7. Laberinto acuático en Y. Estructura del laberinto y área de trabajo donde se evaluó el aprendizaje y memoria en ratones. Tomada de Hernández-Aguilar, 2013.

7.6. *Técnica de inmunohistoquímica*

Los cerebros de los ratones fueron seccionados en cortes coronales de 40 μm de grosor a lo largo del eje rostro-caudal por medio de un criostato (American Optical) y se mantuvieron en buffer TBS para su inmediato uso. El método de marcaje empleado fue por flotación libre con breves modificaciones a lo previamente reportado (Kronenberg, 2006). El número de células inmunoreactivas a los diferentes marcadores se determinó en cada tercera sección de cada cerebro de todos los animales.

La técnica consistió en lavar los cortes con TBS 1x (0.5 M Tris-base y 0.9 % NaCl pH 7.4) y posteriormente se mantuvieron en solución de peróxido de hidrógeno al 3% en TBS 1x por 30 minutos, para bloquear las peroxidasas endógenas.

Después de este proceso, los cortes se mantuvieron en un pre-tratamiento. Para la detección de BrdU los cortes estuvieron en una solución de HCl al 2N por 30 minutos a 37°C y después se mantuvieron en un solución amortiguadora de boratos pH 8.5 (0.1 M ácido bórico) por 10 minutos. Para la inmunodetección de DCX el pre-tratamiento consistió en colocar las muestras en solución amortiguadora de citratos pH 6 (10mM Citrato de sodio y 0.05% Tween 20) durante 2 h a 50 °C.

Al término de los pre-tratamientos, los cortes fueron bloqueados con TBS-Plus (triton X-100 al 10% y suero de burro al 3% en TBS1x) por 30 minutos y se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales específicos diluidos en TBS-Plus; anti-BrdU (anticuerpo monoclonal purificado de rata, diluido 1:1000, Abcam) y anti-DCX (anticuerpo monoclonal purificado de cabra, diuido 1:500, Santa Cruz).

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, los cortes fueron lavados con TBS 1x para su preparación con los anticuerpos biotinilados secundarios específicos en TBS-Plus (anti-rat y anti-goat, JacksonImmunoResearch Inc.) durante 2 h a temperatura ambiente.

Una vez terminada la incubación, se amplificó la señal con el complejo avidina-biotina (6 µl/ml; ABC Vectastain Elite, Vector Laboratories) durante 1 hora. Posteriormente se utilizó diamonobencidina (DAB, Sigma) como cromógeno durante 5 minutos a una concentración de 0.40 mg/ml en TBS con 3 % de peróxido de hidrógeno y 3 % de sulfato de níquel. El paso siguiente fue colocar el tejido en lavados de TBS 1x y se mantuvieron brevemente en solución de montaje (0.1 % de gelatina y alcohol al 40%) para después montarlos en los portaobjetos. Finalmente, se deshidrataron los cortes y se cubrieron con cubreobjetos con medio de montaje Entellan (Merck-Millipore) para su observación en el microscopio.

7.7. Cuantificación de células positivas a BrdU y DCX

Las células inmunoreactivas a BrdU y DCX fueron cuantificadas a lo largo del eje rostro-caudal de la zona granular y subgranular del GD del hipocampo con ayuda de un microscopio de luz Olympus (CH30). Con una cámara fotográfica (DP11) acoplada al microscopio se obtuvieron fotografías con el objetivo 10X y fueron posteriormente analizadas con el software Image Pro-Plus 6.0 (Washington, E. U.). Los datos fueron multiplicados por 3 para obtener el estimado del número total de células con marcaje para cada uno de los marcadores.

7.7.1. Análisis del marcaje por región hipocampal.

Por otro lado, hay investigaciones que regionalizan el hipocampo tomando en cuenta que puede estar asociado a funciones específicas y una de las regionalizaciones más comunes es a través del eje antero-posterior (Colombo et al., 1998; Uchida 2005). Considerando esta información, decidimos analizar también la proliferación celular en el eje longitudinal del hipocampo de los ratones bajo nuestro modelo de isquemia cerebral. El hipocampo (incluido el GD) fue dividido en tres regiones; anterior, medio y posterior. La región anterior corresponde a los cortes que abarcan, tomando como referencia el bregma, de los -1.34 a -2.05 mm. La zona media corresponde de los -2.06 a -2.9 mm y la región posterior, de los -2.91 a -3.80. La Figura 8 muestra a partir de que cortes se consideraban las diferentes regiones.

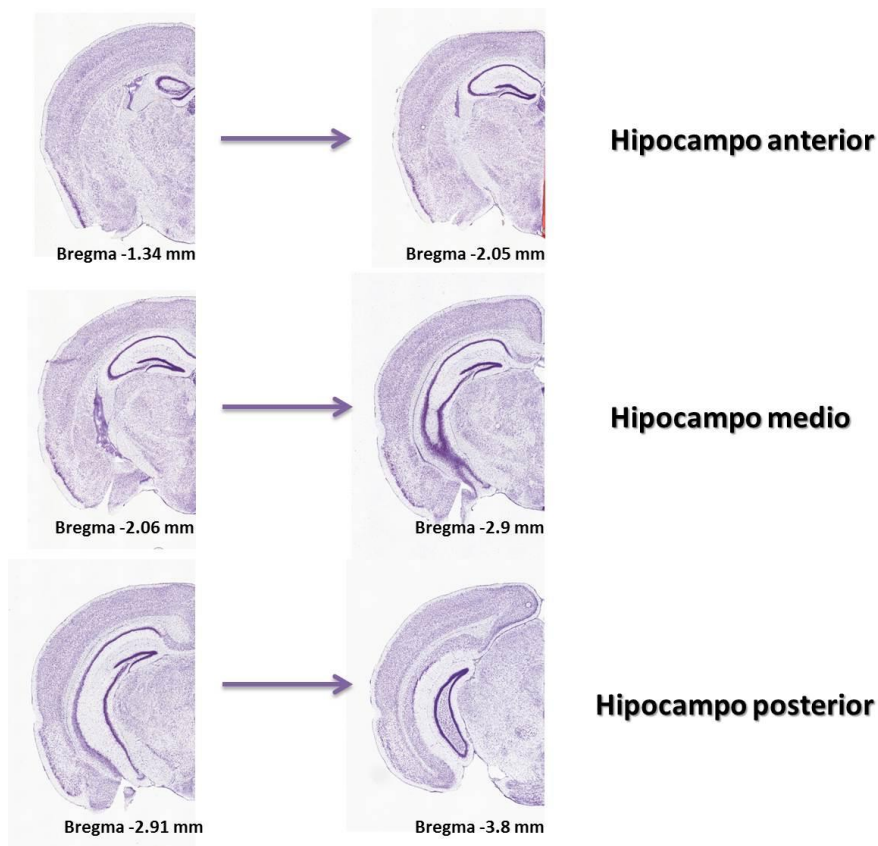


Figura 8. Cortes histológicos de hipocampo. Las imágenes muestran a que longitud se consideraron las categorías. Imágenes tomadas y modificadas del Allen Developing Mouse Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>).

7.8. *Análisis estadístico*

Las curvas de supervivencia fueron calculadas por el método de Kaplan-Meier y comparadas usando la prueba de rangos logarítmicos (Log-Rank test). En el caso de la curva de adquisición se usó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de una prueba de Tukey. Para el análisis de la latencia de escape, número de errores y neurogénesis se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de Dunn. Finalmente, en la comparación por regiones del hipocampo en la proliferación celular y diferenciación neuronal se llevó a cabo una t-Student pareada. Todos los análisis se realizaron por medio del programa operativo GraphPad Prism versión 5.0 de Windows (GraphPad Prism, San diego, CA). Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

8. Resultados

8.1. *Sobrevivencia*

Después de la primera y segunda intervención quirúrgica no hubo cambios significativos en la sobrevivencia de los ratones del grupo Control (n=17) y Sham (n=15) (Figura 9A). En cambio, el grupo isquémico (SSACC), que inicialmente empezó con una n=69, tuvo una baja de 9 ratones a lo largo de los 3 días posteriores a la primera cirugía. Esta proporción de sobrevivencia en el grupo isquémico (93.57%), no difirió significativamente de la proporción del grupo Control y Sham, ambos con 100% (Figura 9A). Por otro lado, después de la segunda cirugía los ratones isquémicos fueron divididos en 2 grupos; los que no recibieron tratamiento farmacológico (SSACC; n=34) y los que recibieron dexrazoxano (SSACC/DEX; n=19). El porcentaje de sobrevivencia en ratones isquémicos después de 96 horas fue de 45.45% ($P < 0.0001$, con respecto al Control), mientras que los que recibieron el fármaco la proporción fue de 81.36% ($P < 0.01$, con respecto al Control; $P < 0.0001$, con respecto a SSACC) (Figura 9B).

Para comparar los efectos del dexrazoxano en la sobrevivencia por sus propiedades como antioxidante, se decidió probar otro ampliamente usado, el ácido α -lipoico (AL). A un grupo de ratones (n= 10), que se les seccionó la segunda arteria, se les administró 100 mg/kg de AL (SSACC/AL) y se registró la sobrevivencia. Después de las 96 horas, este grupo presentó una proporción de sobrevivencia de 75%, siendo significativamente diferente al grupo SSACC ($P < 0.05$) y al Control ($P < 0.01$) (Figura 9B).

Adicionalmente, se analizó el efecto del dexrazoxano sobre animales controles (DEX) para descartar una posible toxicidad. En cuanto a sobrevivencia, se apreció que a los 3 días la proporción de sobrevivencia en el grupo fue de 94.73%, siendo no diferente, estadísticamente, al grupo Control (Figura 9C).

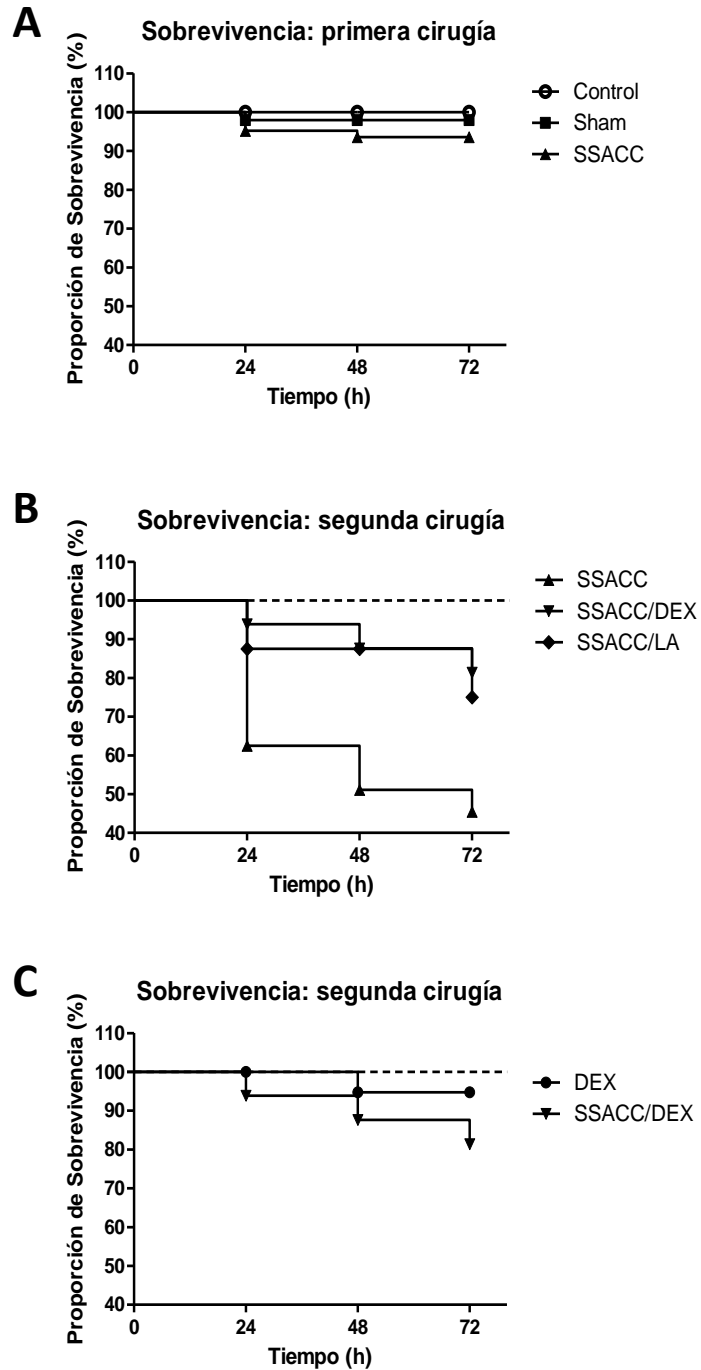


Figura 9. Curvas de sobrevivencia. **A.** Proporción de sobrevivencia después de la primera cirugía. **B.** Sobrevivencia después de la segunda cirugía y con la administración de dexrazoxano y AL. **C.** Efecto del dexrazoxano en los grupo Control y SSACC. (- - -) Referencia de la posición del grupo Control y Sham. SSACC vs Control, $P < 0.0001$; SSACC/DEX vs Control, $P < 0.01$, SSACC/AL vs Control, $P < 0.01$; SSACC/DEX vs SSACC, $P < 0.001$; SSACC/AL vs SSACC, $P < 0.05$.

8.2. Laberinto acuático en Y (LAY)

Después de cuatro días de entrenamiento en el LAY, la latencia de escape de todos los ratones, sin aún haberse asignado a los diferentes grupos empleados, fue disminuyendo con respecto al primer día, siendo significativa en el tercer y cuarto día (Figura 10), mostrando que los animales aprendieron la tarea. Posteriormente, los ratones fueron sometidos a la misma prueba en el quinto día con el fin de evaluar la línea base. Este tiempo de medición se llevó a cabo como referencia previa al efecto de la primera y segunda intervención quirúrgica. En las líneas bases de la primera y segunda cirugía no existieron diferencias significativas entre los diferentes grupos de ratones en los parámetros empleados, latencia de escape y número de errores (datos no mostrados).

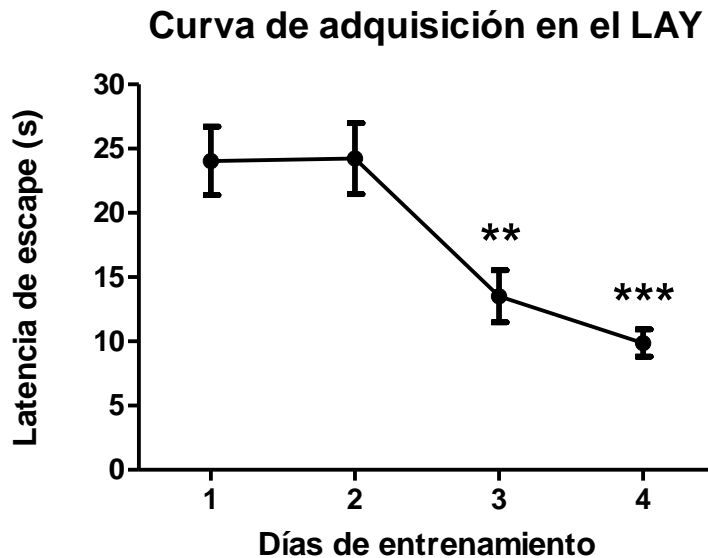


Figura 10. Curva de adquisición. Todos los ratones fueron entrenados en el LAY por cuatro días y se registró la latencia de escape. Los datos presentados muestran la media \pm E.E.M. $n=101$. Los datos fueron analizados con una ANOVA seguida de una prueba de Tukey *post hoc*. El tiempo difirió significativamente al tercer día ($P<0.01$) y cuarto día ($P<0.001$), con respecto al primer día.

Una vez formados los grupos experimentales y una vez realizada la primera sección de las carótidas, se analizó el desempeño de los ratones en el LAY a las 24, 48 y 72 horas consecutivas. Durante esos tiempos no se observaron cambios estadísticamente diferentes (Prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de Dunn).

Sin embargo, después de la inducción de la isquemia aguda por corte de la segunda carótida, se lograron apreciar cambios en los ratones en la latencia de escape a las 24, 48, 72 y 96 h (Figura 11A). El grupo Control y Sham permanecieron en tiempos y número de errores no significativamente diferentes con respecto a la línea base durante toda la evaluación. Sin embargo, el grupo SSACC presentó una elevación en la latencia de escape y número de errores a las 48 h, pero no fue diferente significativamente al Control, manteniéndose estable hasta las 96 h (Figura 11A y 11B). Por otro lado, el grupo SSACC/DEX mostró una tendencia a elevar el tiempo en encontrar la plataforma y el número de errores desde las 24 h post-cirugía y fue significativo a las 72 h con respecto al control ($P < 0.01$), sólo en la latencia de escape (Figura 11A).

Para contrastar el efecto adverso que pudiera tener el dexrazoxano, probamos el fármaco en un grupo control. El grupo DEX no mostró cambios en la latencia de escape y número de errores comparándolo con el grupo Control (Figura 11A y 11B).

Por otro lado, el antioxidante AL no manifestó una elevación en los parámetros examinados después del evento isquémico (Figura 11A y 11B).

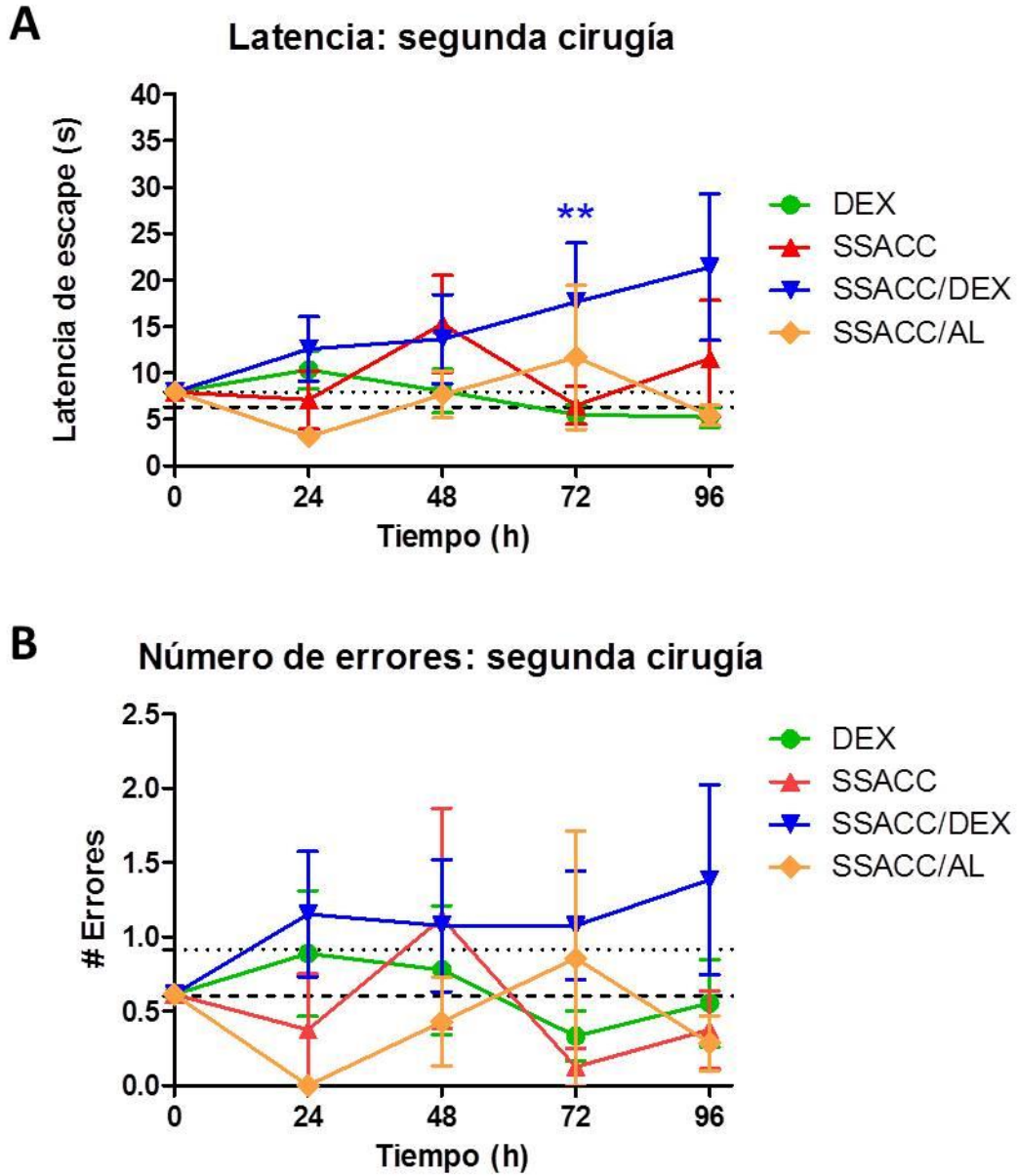


Figura 11. Gráficas de los parámetros de memoria en el laberinto acuático después de la segunda cirugía. **A.** Gráfica de latencia de escape. **B.** Gráfica de número de errores. Los datos presentados muestran la media \pm E.E.M. Control n=17, Sham n=15, SSACC n=8, SSACC/DEX n=13, SSACC/AL n= 7. (***) Referencia promedio del grupo Control. (- - -) Referencia promedio del grupo Sham..Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de Dunn. ** P<0.01 con respecto al grupo Control. No se encontró diferencia significativa entre los grupo Contro y Sham

8.3. Neurogénesis

8.3.1. Proliferación celular

Después de analizar los efectos de nuestro modelo de isquemia sobre la sobrevivencia y memoria en ratones, decidimos evaluar los efectos de este modelo sobre el proceso neurogénico. Se ha sugerido que la neurogénesis en el hipocampo adulto tiene un papel importante en el desempeño de tareas en laberintos que miden memoria espacial, además que en los modelos de isquemia cerebral se produce un aumento de nuevas células positivas a BrdU.

En la Figura 12 podemos apreciar los resultados de la inmunohistoquímica contra BrdU en el GD del hipocampo en ratones control, isquémicos y tratados con dexrazozano.

Las fotografías representativas del GD son mostradas en la Figura 12 A, con una magnificación de 40X para ejemplificar el marcaje de las células positivas a BrdU en la zona subgranular en la Figura 12 B. Como se puede apreciar en la gráfica (Figura 12 C), no existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos. Sin embargo, se puede observar una tendencia a aumentar las células positivas por parte del grupo Sham y SSACC pero sin ser significativas, lo cual sugiere que nuestro modelo de isquemia cerebral no estaría afectando la proliferación celular en el GD del hipocampo.

Por otro lado, analizamos si existían modificaciones en la proliferación celular en tres diferentes regiones del hipocampo; anterior, medio y posterior, entre el grupo isquémico sin tratamiento y al que le fue administrado el fármaco. Los resultados de estos son presentados en la Figura 13.

En la gráfica podemos apreciar que los ratones isquémicos presentan una tendencia a expresar más células con marcaje contra BrdU en el área media y posterior del hipocampo. Sin embargo, esta tendencia no es significativa.

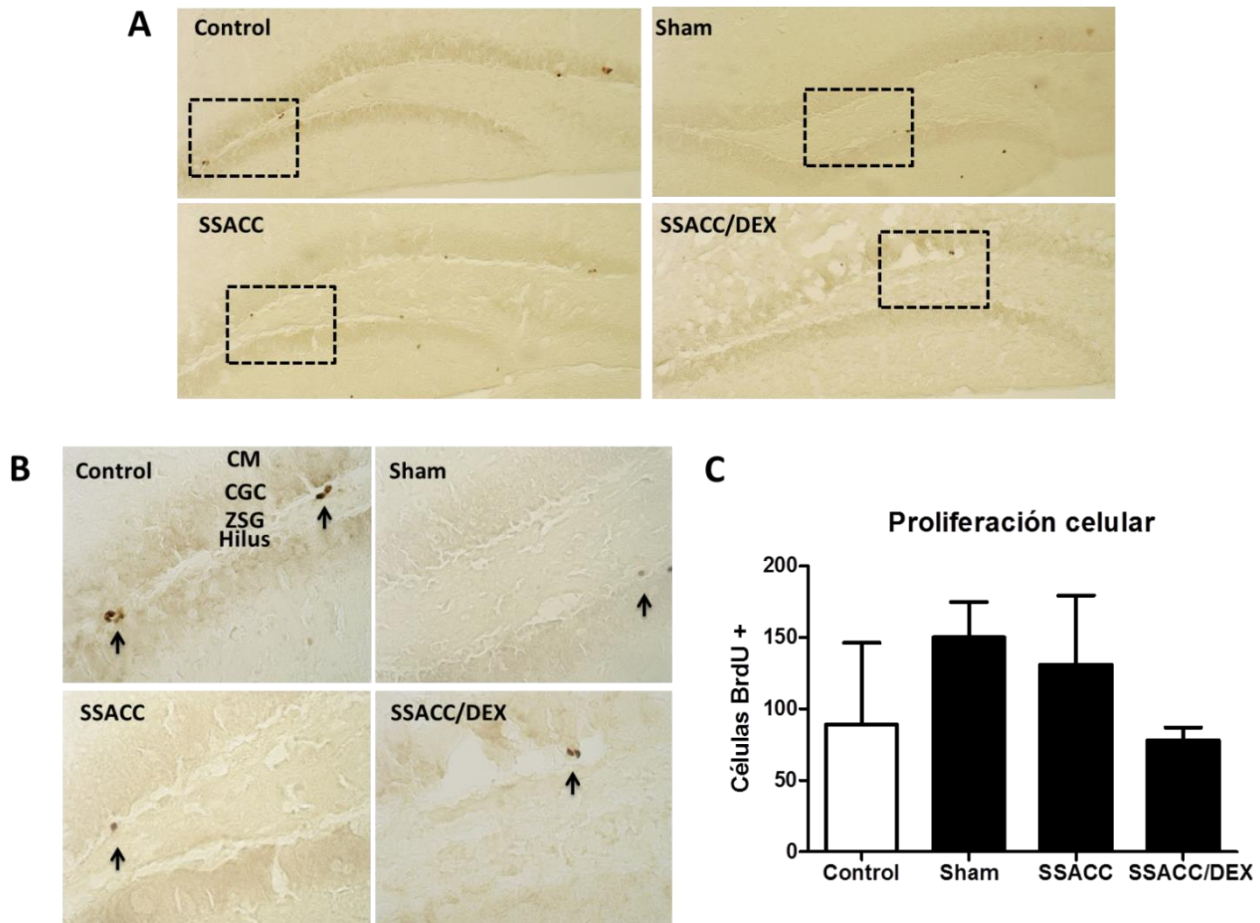


Figura 12. Proliferación celular. **A.** Fotografías representativas del hipocampo y GD marcadas contra BrdU. **B.** Imágenes magnificadas del GD del hipocampo donde se aprecian las diferentes capas de este y el marcaje de células positivas a BrdU considerada para su cuantificación. **C.** Gráfica del marcaje total cuantificado contra BrdU. Los datos presentados muestran la media \pm E.E.M. Control n=3, Sham n=3, SSACC n=3, SSACC/DEX n=3. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de Dunn. **CM:** Capa molecular, **CGC:** Capa granular celular, **ZSG:** Zona subgranular celular.

Proliferación celular: regiones de hipocampo

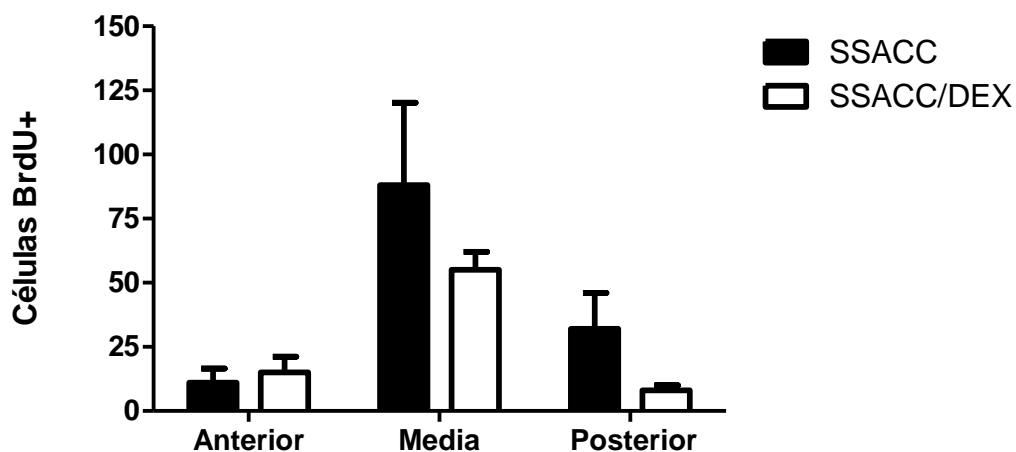


Figura 13. Proliferación celular por regiones de hipocampo. Los datos presentados muestran la media \pm E.E.M. Las gráficas muestran las células positivas a BrdU en el área anterior, media y posterior del hipocampo en los grupos SSACC (n=3) y SSACC/DEX (n=3). Los datos fueron analizados para cada región por la prueba t-Student pareada.

8.3.2. Diferenciación neuronal

Además del análisis sobre la proliferación celular en el hipocampo, se llevó a cabo una exploración sobre la diferenciación neuronal a través del marcaje de células que expresaron DCX en el GD.

Los resultados sobre el número total de neuronas marcadas en los diferentes grupos son presentados en la Figura 14. Las fotos representativas del GD con el marcaje de DCX son presentados en la Figura 14 A. Una ampliación a 40X donde se señalan las células con marcaje son presentadas en la Figura 14 B. Al igual de lo que se pudo observar con el marcaje contra BrdU, se muestra una tendencia por parte de los grupos Sham y SSACC de incrementar el número de células inmunoreactivas a DCX, sin embargo nuestros resultados no muestran diferencias significativas contra el grupo tratado con DEX debido a la amplia dispersión en el error estándar.

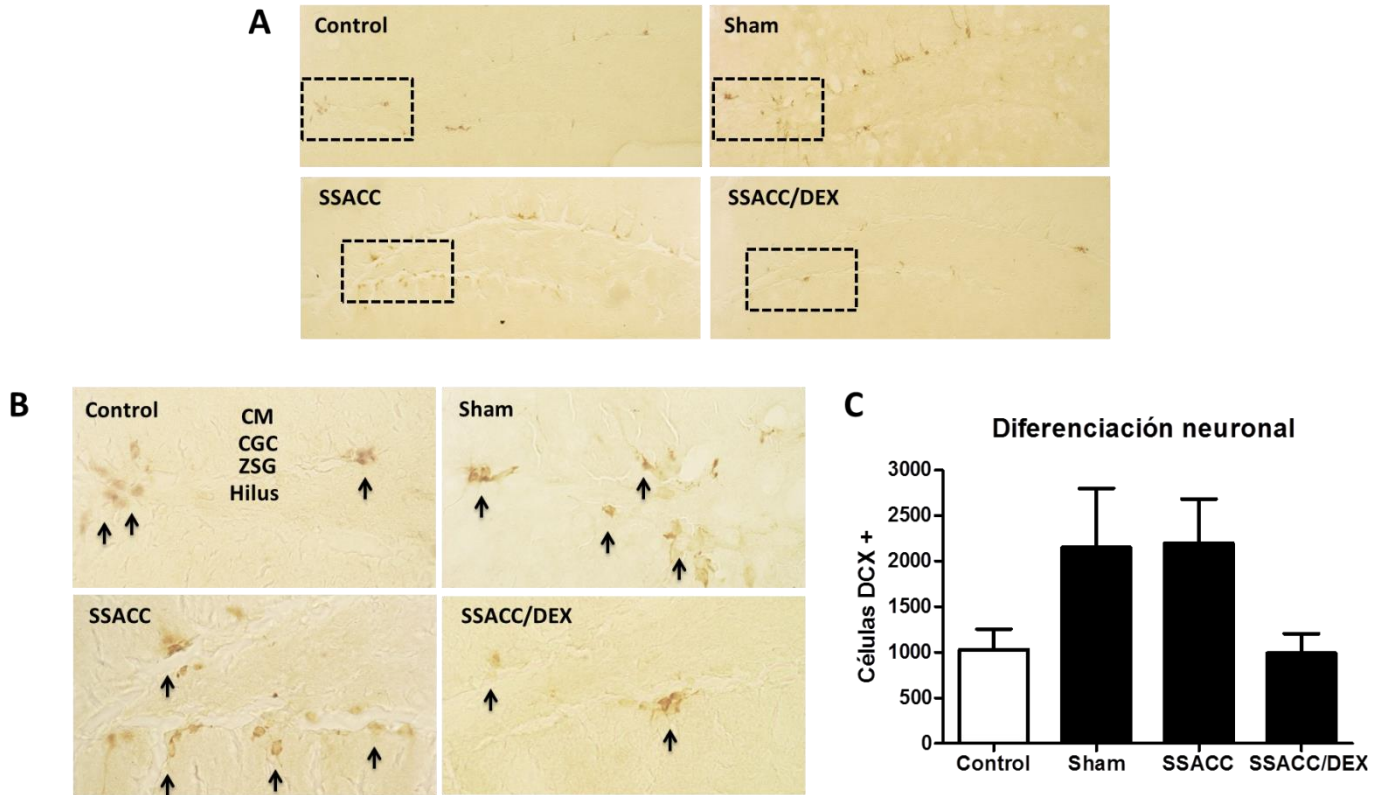


Figura 14. Diferenciación neuronal. **A.** Fotografías representativas del hipocampo y GD marcadas contra DCX. **B.** Imágenes magnificadas del GD del hipocampo donde se aprecian las diferentes capas de este y el marcaje de células positivas a DCX considerada para su cuantificación. **C.** Gráfica del marcaje total cuantificado contra DCX. Los datos presentados muestran la media \pm E.E.M. Control n=5, Sham n=5, SSACC n=5, SSACC/DEX n=5. Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de Dunn. **CM:** Capa molecular, **CGC:** Capa granular celular, **ZSG:** Zona subgranular celular.

De manera similar a la proliferación celular, se examinó los posibles cambios en la diferenciación neuronal sobre el eje antero-posterior (Figura 15). En las tres regiones del hipocampo se nota una tendencia al aumento de células positivas contra DCX en el grupo isquémico con respecto al grupo con tratamiento farmacológico, aunque no es significativo, esta tendencia es más pronunciada en la parte media ($P=0.0565$, SSACC vs SSACC/DEX).

Diferenciación neuronal: regiones de hipocampo

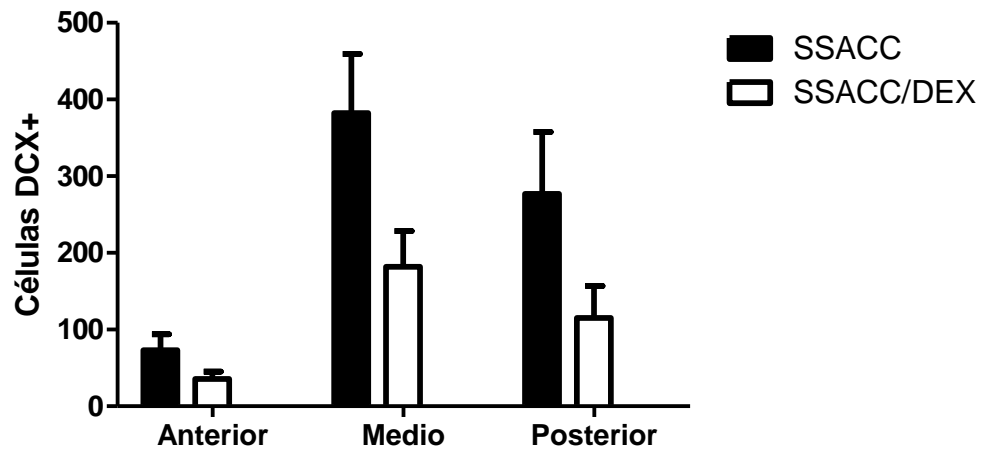


Figura 15. Diferenciación neuronal por regiones de hipocampo. Los datos presentados muestran la media \pm E.E.M. Las gráficas muestran las células positivas a DCX en el área anterior, media y posterior del hipocampo en los grupos SSACC (n=5) y SSACC/DEX (n=5). Los datos fueron analizados para cada región por la prueba t-Student pareada.

9. Discusión

Debido a los buenos resultados que muestra nuestro modelo de isquemia para evaluar el efecto de fármacos y su posible traslado a la clínica, decidimos valorar si este producía alteraciones cognitivas en la memoria y neurogénesis, y de ser así, si estas podrían ser revertidas por el dexrazoxano. Los resultados del efecto de la isquemia en la sobrevivida de los ratones en los diferentes grupos, indican que después de la primera cirugía, en el modelo de SSACC, no existen diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con lo que previamente ha reportado nuestro grupo de trabajo, donde el estado de hipoperfusión generado en la primera cirugía induce un porcentaje bajo de muertes en los ratones (Hernández-Aguilar, 2013, Alejo-Martínez, 2010; Fuentes-Vargas et al., 2002). Esto puede ser explicado debido a que el cerebro de los ratones genera un sistema de compensación después de la sección de la arteria izquierda, este mecanismo se ve reflejado en el aumento del diámetro de las arterias cerebrales del circulo de Willis y contrarresta la falta de sangre por la oclusión evitando un porcentaje elevado de muertes y alteraciones cognitivas y motoras (Rodríguez et al, 2000a).

Por otra parte, apreciamos que a las 96 h después de la segunda intervención quirúrgica la proporción de sobrevivencia se ve diezmada en los ratones isquémicos no tratados con el fármaco (SSACC) hasta en un 45.45%. Previamente se ha reportado en el laboratorio que existe una gran tasa de mortalidad en ratones sometidos al corte de la segunda carótida (Rodríguez et al., 2000; 2000b; Fuentes-Vargas et al., 2002; Rodríguez et al., 2003; Alejo Martínez, 2010; Hernández-Aguilar, 2013), lo que valida los resultados mostrados en este trabajo. Durante la sección de la carótida derecha se induce la isquemia aguda, la oclusión del flujo sanguíneo es severa, de tal forma que la proporción de muerte en los animales es elevada y se genera un área de infarto amplia que engloba de manera bilateral a la neocorteza, estriado, hipocampo, núcleo septal y polígono de Willis (Rodríguez et al., 2000a), generando así grandes alteraciones motoras (Gómez et al., 2006; Rodríguez et al., 2005; Rodríguez et al., 2003)

Adicionalmente, los reportes de Rodríguez y colaboradores en el 2000 y 2003, ya han mostrado que la administración de dexrazoxano en ratones sometidos a la SSACC reduce significativamente la mortalidad de ratones a dosis de 16, 64, 128 y 256 mg/kg (Rodríguez et al., 2000a; 200b; 2003) Nuestros resultados evidencian que la administración de dexrazoxano (128 mg/kg), aumentó la proporción de sobrevivencia de ratones isquémicos (81.36%) de manera significativa con respecto a los que sólo recibieron vehículo ($P < 0.0001$), aunque no a niveles comparables con el Control y Sham. Como ya se mencionó anteriormente, el dexrazoxano es un poderoso quelante del hierro y aminora la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, fármacos usados para el tratamiento del cáncer en diferentes modelos animales (Sun et al, 2015; Feridooni et al., 2013; Spagnuolo et al., 2011; Zhou et al., 2011; Xiang et al., 2009) y en la clínica (Sepe et al, 2010; Lipshultz et al, 2010; Choi et al, 2010).

El mecanismo ampliamente estudiado por el que actúa el dexrazoxano consiste en la inhibición de la reacción de Fenton, que necesita hierro para producir la formación de radical OH^\bullet , la ERO más reactiva que induce un estado de estrés oxidante (Simůnek et al., 2009; Popelová et al., 2009;), aunque se ha propuesto que puede actuar directamente como secuestrador de ERO, como el anión superóxido y el radical hidroxilo (Zhang et al., 2010; Galetta et al., 2010). Otros estudios plantean que el dexrazoxano secuestra la acumulación de hierro en la mitocondria durante la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina (Ichikawa et al., 2014), incrementa la activación de las proteínas Akt y Erk (Xiang et al., 2009) y la inducción del factor inducible de hipoxia (HIF) (Spagnuolo et al., 2011). Sin embargo, estas propiedades han sido demostradas solo en cardiomiocitos, no existen reportes que hayan probado este fármaco en el cerebro.

Nosotros proponemos que el efecto del dexrazoxano en nuestro modelo en la sobrevivencia podría depender de alguno de estos mecanismos. Hay que recordar que durante la cascada isquémica hay una disrupción del equilibrio del hierro, aumentando su concentración (Minhas et al., 2014; Selim y Ratan, 2004),

favoreciendo el estrés oxidante inducido por la excitotoxicidad y altas concentraciones de Ca^{2+} .

Para probar si el posible efecto neuroprotector del dexrazoxano se debe a su capacidad como antioxidante, decidimos compararlo con uno que ha sido bien caracterizado y probado, el ácido α -lipoico (AL).

Lo que pudimos observar con la administración de AL en ratones isquémicos fue una reducción de la tasa de mortalidad y una sobrevivencia de 75%, diferentemente significativa del grupo SSACC, lo que sugiere un efecto protector. Estos resultados concuerdan con los reportes que muestran que el AL reduce el daño inducido por isquemia focal (Choi et al., 2015, Fu et al., 2014, Richard et al., 2011) y aumenta la sobrevivencia después de la SSACC (Santiago-Mejía, 2005).

Se ha detallado que este modelo de isquemia puede producir alteraciones motoras, sin embargo las alteraciones cognitivas no han sido evaluadas, sobre todo en la memoria. Para dilucidar una posible alteración por parte de la SSACC, realizamos el paradigma del LAY, previamente descrito (Hernández-Aguilar, 2013), como alternativa al laberinto acuático de Morris, ya que previamente hemos caracterizado que el esfuerzo en esta prueba es muy demandante físicamente para que lo realizaran los ratones en nuestro modelo de isquemia. A partir de los resultados se puede analizar que no hay alteraciones conductuales importantes, excepto por el aumento de la latencia de escape y número de errores por parte del grupo SSACC/DEX a las 72 horas. Cabe aclarar que los animales con alteraciones motoras fueron descartados para evitar falsos positivos.

Debido a que durante los eventos isquémicos el hipocampo es de la regiones recurrentemente afectadas y que esta se asocia con los procesos de aprendizaje y memoria, está bien establecido que los modelos de isquemia en ratas generan alteraciones en las diferentes pruebas que evalúan la memoria espacial, como el laberinto acuático de Morris (Wan et al., 2015; Oz et al, 2014; Shih et al., 2013; Soares et al., 2013; Zhao et al., 2013). A diferencia de estos reportes, en nuestro modelo de isquemia, el grupo SSACC no presentó alteraciones significativas al

momento de llevar a cabo la tarea. Smith y colaboradores (2014), han mostrado que el daño ocasionado por isquemia cerebral podría no afectar la memoria en la realización de tareas sencillas o repetitivas en pruebas de memoria espacial en ratas, y que pueden aprender pruebas más complicadas de manera gradual, a nivel comparable con los grupos Sham (Smith et al., 2014). Por lo tanto, la tarea que realizan los ratones en el LAY, podría ser muy sencilla y repetitiva, lo que explicaría que los ratones isquémicos no fueron afectados en el proceso de memoria. Esta conclusión también podría remitirnos a las investigaciones que muestran que el daño en el hipocampo posterior al aprendizaje y memoria de una tarea, no afecta su evocación, es decir, la memoria a largo plazo (Willshaw y Buckingham, 1990; Ramos, 2000; Maviel et al, 2004; Broadbent et al., 2006), ya que la adquisición de la tarea fue 5 semanas antes del evento isquémico. Por otro lado, no descartamos posibilidad de que la prueba de LAY, no es lo suficientemente sensible para evaluar si existe una alteración cognitiva a nivel de memoria, debido a la facilidad y repetitividad con que desempeñan los ratones la tarea.

Lo más interesante de esta prueba es que el grupo isquémico que recibió dexrazoxano mostró más complicaciones en realizar la tarea a las 72 h, lo que sugiere que el fármaco podría estar interfiriendo en algún proceso celular importante o su mecanismo de acción podría estar promoviendo la sobrevivencia pero no es suficiente para restablecer funciones neurológicas. Reportes previos han demostrado que el dexrazoxano puede ayudar a la sobrevivencia de ratas con cardiotoxicidad inducida por catecolaminas, pero que este efecto protector no está implicado directamente con su capacidad como quelante de hierro (Zatloukalová et al., 2012).

El GD, es una estructura muy importante en el hipocampo, ya que se le ha asociado con los procesos de memoria y particularmente en el establecimiento y uso de representaciones espaciales (Eichenbaum, 2000; Scharfman, 2007). También se ha descubierto que en el GD se desarrolla la neurogénesis en adultos, un proceso que ha sido relacionado fuertemente con la memoria espacial en

diferentes modelos de animales (Zhang et al., 2015; Yang et al., 2015; Tronel et al., 2015; Dupret et al., 2008).

Para caracterizar si nuestro modelo de isquemia cerebral tiene algún efecto sobre la neurogénesis en el GD del hipocampo en adultos, y una posible relación con la memoria en el LAY, analizamos en el cerebro la proliferación celular y diferenciación neuronal por inmunohistoquímica a las 48 h después de la segunda cirugía. Cabe aclarar que los animales usados no realizaron la prueba de LAY.

Los resultados muestran que la expresión total de células positivas a BrdU y DCX en nuestro modelo no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos, aunque si una tendencia a estar elevada en los grupos Sham y SSACC.

En primer lugar, se ha documentado que la isquemia puede inducir un aumento en la neurogénesis del GD del hipocampo en roedores (Sun et al., 2015; Manzanero et al., 2014; Fan et al., 2014; Spacacapelo et al., 2013; Quintard et al., 2011; Wang et al., 2011) e incluso este efecto ha sido demostrado en ratones envejecidos (Tan et al., 2010). La tendencia que observamos en el grupo SSACC puede estar relacionada con estas repuestas por parte del cerebro ante un daño severo. Aunque hemos mencionado que este incremento de células positivas a BrdU y DCX no fue significativo, esto podría deberse a que el número de ratones empleados fue bajo, debido a la alta tasa de mortalidad; por lo que sería interesante incrementar el número de animales para dilucidar una significancia. Adicionalmente, pudimos apreciar que el grupo de ratones que recibió el tratamiento con dexrazoxano inhibe la respuesta de la proliferación celular en los ratones isquémicos a niveles semejantes al control y en el caso de las nuevas neuronas, reducirlas en mayor grado. Si bien no existe reportes que describan si el dexrazoxano puede disminuir la neurogénesis, si es sabido que disminuye la proliferación de células cancerígenas por sus propiedades como inhibidor de la topoisomerasa II (Hasinoff et al., 2001; Vavrová et al., 2013; Deng et al., 2014; Deng et al., 2015), lo que nos lleva a plantear la pregunta si durante un evento de isquemia el dexrazoxano, además de expresar sus mecanismos benéficos, puede llevar a cabo esta función en las células precursoras neuronales.

Se ha sugerido que el hipocampo pueden regular diferentes procesos, por un lado, la región anterior (dorsal) ha demostrado tener un rol importante en el aprendizaje y memoria espacial (Tan et al., 2015; Pierson et al., 2015; Strange et al., 2014; Cholvin et al., 2014; Bertoglio et al., 2006), mientras que la parte posterior (ventral) regula procesos de ansiedad y modulación del estrés (Weeden et al., 2015; Strange et al., 2014; Bertoglio et al., 2006; Trivedi y Coover, 2004; Kjelstrup et al., 2002). Adicionalmente, las investigaciones en el campo de la neurogénesis corroboran que las nuevas neuronas formadas en el GD desempeñan un papel importante de estas mismas funciones en el eje dorsoventral (Boterrill et al., 2015; O'Leary y Cryan, 2014; Abboussi et al., 2014; Felice et al., 2012; O'Leary, 2012; Hawley et al., 2012; Eadie et al., 2009).

Al analizar nuestros hallazgos, observamos que la regionalización que realizamos del hipocampo en anterior, media y posterior, correspondería la primera a la zona dorsal y la última a la ventral, siendo la parte media, la parte de transición entre estas.

La Figura 13 y 15 muestra que las zonas que presentaron una tendencia al incremento en el grupo isquémico en la proliferación celular y diferenciación neuronal fueron la parte media y posterior. Esto nos podría llevar a interpretar que este aumento es en respuesta a la modulación de la respuesta al estrés que implica el nadar para los ratones, y que ha sido reportada, más que a una respuesta para compensar las alteraciones en la memoria. Sin embargo, el grupo con dexrazoxano presenta niveles de proliferación celular comparables al control, lo que muestra que esta respuesta podría ser no necesaria en el grupo SSACC o está siendo inhibida.

Por otro lado, es interesante notar que para las células que expresaron DCX el aumento también fue alto en el grupo con isquemia en la región anterior, con respecto al grupo tratado, aunque no fue significativo. Es decir, es probable que este aumento en el grupo isquémico se deba al reclutamiento de nuevas neuronas para compensar el esfuerzo para mantener la consolidación de la memoria en el grupo isquémico. Se ha demostrado previamente que el aumento de neurogénesis

está asociada a la recuperación funcional en pruebas conductuales de animales con isquemia (Choi et al., 2015; Qu et al., 2015; Tsai et al., 2013; Zhang et al., 2012; Luo et al., 2007). Además, en ratones envejecidos, la inhibición de células positivas a DCX en ratones isquémicos demuestra la incapacidad de recuperar funciones motoras (Sun et al., 2015). En cambio, el grupo con dexrazoxano no presenta este incremento posiblemente por una alteración del fármaco en conjunción con la isquemia. Nuevamente, se sugiere que la SSACC no muestra alteraciones en la memoria de nuestros ratones por una compensación en la diferenciación de nuevas neuronas que tendrían la función de mantener los procesos de consolidación.

Para finalizar, hay gran controversia para elucidar si la neurogénesis que se ve incrementada podría ser funcional. Como se mencionó anteriormente, existen estudios que demuestran que el aumento de neurogénesis en conjunto con tratamientos puede incrementar la capacidad de amortiguar los déficits en la memoria espacial (Tsai et al., 2013; Luo et al., 2007; Zhang et al., 2012) y pruebas motoras (Choi et al., 2015; Qu et al., 2015; Sun et al., 2012). Sin embargo, existen investigaciones que proponen que la neurogénesis en la isquemia promueve que se integren neuronas de manera aberrante, lo que conlleva a un deterioro cognitivo (Niv et al., 2012) o que su estimulación con fluoxetina no recupera funciones durante la isquemia (Sun et al., 2015), además de que la mayoría de las células de nueva generación tras un evento isquémico mueren varias semanas después de la isquemia (Doepfner et al., 2009; Hass et al., 2005; Parent, 2003).

Por lo tanto, habrá que realizar más investigaciones sobre el tema para discernir hasta donde los procesos de plasticidad en el cerebro pueden permitir la recuperación de ciertas funciones.

Cabe aclarar que si bien el déficit cognitivo que presentó el dexrazoxano fue hasta las 72 h, mientras que el análisis inmunohistoquímico se realizó a las 48 h, esto puede relacionarse pese a la diferencia de un día, ya que el cambio celular puede anteceder al cambio conductual.

La Figura 16 se muestra un esquema representativo de los resultados obtenidos con los mecanismos con los que se sugiere que actúa nuestro modelo de isquemia y el efecto del dexrazoxano.

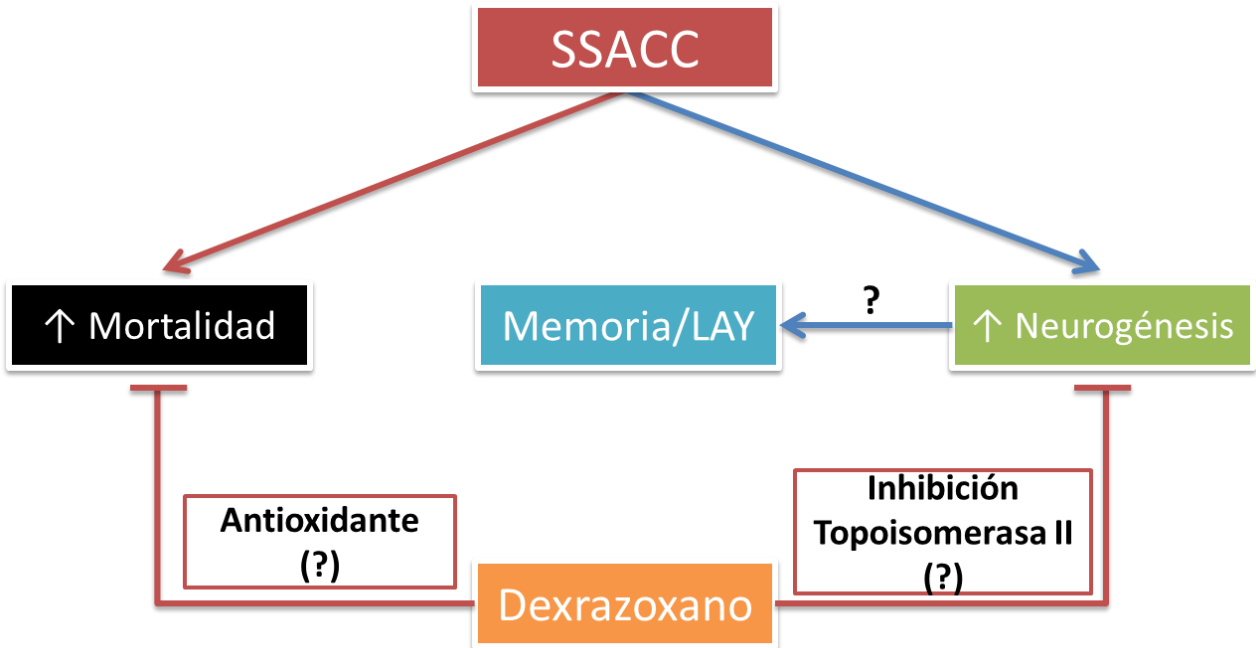


Figura 16. Diagrama representativo del efecto de la isquemia y dexrazoxano. El modelo de SSACC aumento la mortalidad en los ratones pero favoreció el incremento de la proliferación celular y diferenciación neuronal. Por otro lado el dexrazoxano aumentó la supervivencia en los ratones isquémicos pero inhibió la repuesta neurogénica, probablemente afectando el desempeño de los animales en el LAY. Los mecanismos posibles por lo que ocurre este efecto son mostrados en los cuadros blancos.

10. Conclusiones

- Nuestro modelo de isquemia de SSACC indujo una alta proporción de mortalidad y una tendencia a aumentar la proliferación celular y diferenciación neuronal en el giro dentado del hipocampo. Pero no afectó la ejecución de la tarea en el LAY.
- De manera específica, los ratones isquémicos tendieron a aumentar las células positivas a BrdU en la región media y posterior del giro dentado del hipocampo, mientras que las células inmunoreactivas a DCX aumentaron en la región anterior, media y posterior.
- La administración de dexrazoxano aumentó significativamente la sobrevivencia en ratones isquémicos, pero parece reducir la proliferación celular y diferenciación neuronal con respecto al grupo SSACC. Además mostró alterar la realización de la tarea en el LAY a las 72 h.
- El uso del AL mostró una reducción en la mortalidad inducida por nuestro modelo de isquemia, además no alteró la latencia de escape de nuestros ratones en el LAY.

11. Perspectivas

Este trabajo refleja una parte de un gran proyecto enfocado en caracterizar el modelo de SSACC y su uso para la búsqueda de tratamientos neuroprotectores que puedan ser trasladados a la clínica, sin embargo, es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones para trabajos futuros:

- Analizar si el modelo del LAY es lo suficientemente sensible para analizar aprendizaje y memoria.
- Caracterizar los mecanismos por los cuales el dexrazoxano produce sus efectos al aumentar la sobrevivencia pero inhibir la neurogénesis.
- Establecer si las posibles alteraciones producidas por el dexrazoxano en la memoria son reversibles con el tiempo.
- Elucidar si la administración del dexrazoxano en un grupo control produce deterioro en la neurogénesis.
- Determinar de manera amplia si el AL podría ser un fármaco que demuestre ser neuroprotector en nuestro modelo de isquemia.

12. LITERATURA CITADA

1. Abboussi O., Tazi A., Paizanis E. y El Ganouni S. 2014. Chronic exposure to WIN55,212-2 affects more potently spatial learning and memory in adolescents than in adult rats via a negative action on dorsal hippocampal neurogenesis. *Pharmacol Biochem Behav* 120: 95-102.
2. Adibhatla R.M. y Hatcher J.F. 2008. Phospholipase A (2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep* 41: 560-7.
3. Alcalá-Ramírez J. y González-Guzmán R. 2007. Enfermedad cerebrovascular, epidemiología y prevención. *Rev Fac Med UNAM* 50: 36-39.
4. Alejo-Martínez, A. 2011. Alteraciones en el aprendizaje y la memoria inducidas por isquemia cerebral aguda en la ejecución del laberinto elevado en cruz en ratones y su modificación por fármacos neuroprotectores (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
5. Allen E. 1912. The cessation of the mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 22:547-68.
6. Altman, J. 1963. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137: 433-57.
7. Altman, J. y Das, G.D. 1965a. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207: 953-6.
8. Altman, J. y Das, G.D. 1965b. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-35.
9. Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV, Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137: 433-57.
10. American Stroke Association. 2008. Heart Disease and Stroke Statistics-2008. Dallas: American Heart Association.

11. Arivazhagan P., Shila S., Kumaran S. y Panneerselvam C. 2002. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp Gerontol* 37: 803-11.
12. Aryal B., Jeong J. y Rao V.A.. 2014. Doxorubicin induced carbonylation and degradation of cardiac myosin binding protein C promote cardiotoxicity. *PNAS* 111: 2011-26.
13. Asociación Mexicana de Enfermedad Vascular Cerebral (AMEVASC). 2002. Mexican consensus for prevention and treatment of cerebrovascular disease. *Rev Invest Clin* 54:245-284.
14. Astrup J., Siesjö B.K. y Symon L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725.
15. Auer R.N., Jensen M.L., y Whishaw I.Q. 1989. Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. *J. Neurosci* 9: 1641-47.
16. Bakheet S. A., Attia S. M., AL-Rasheed N. M., Al-harbi M. M., Ashour A. E., Korashy H. M., Abd-Allah A. R., Saquib Q., Al-Khedhairi A. A. y Musarrat J. 2011. Salubrious effects of dexrazoxane against teniposide-induced DNA damage and programmed cell death in murine marrow cells. *Mutagenesis* 26: 533-43.
17. Bendel O., Bueters T., von Euler M., Ögren S.O., Sandin J. y von Euler G. 2005. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 25: 1586-95.
18. Bertoglio L.J., Joca S.R.L. y Guimarães F.S. 2006. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res* 175: 183-8.
19. Biemond P., Swaak A.J., van Eijk H.G. y Koster J.F. 1988. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radical Biol Med* 4: 185-98.
20. Block F. y Schwarz .1997. Global ischemic neuronal damage relates to behavioural deficits: a pharmacological approach. *Neurosci* 82: 791-803.

21. Botterill J.J., Brymer K.J., Caruncho H.J. y Kalynchuk L.E. 2015. Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic Kindling: relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. *Epilepsy Behav* 47: 83-92.
22. Branston N.M., Strong A.J. y Symon L. 1977. Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex. *J Neurol Sci* 32: 305-321.
23. Brassai A., Suvanjev R.-G., Bán E.Gy. y Lakatos M. 2015. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* 112: 1-6.
24. Broadbent N.J., Squire L.R. y Clark R.E. 2006. Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learning & Memory* 13: 187-191.
25. Camacho A. y Massieu L. 2006. Role of glutamate transporters in clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37: 11-8.
26. Carrillo-Mora P., Giordano M. Y Santamaría A. 2009. Spatial memory: Theoretical and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 203: 151-64.
27. Chiquete E., Ruíz-Sandoval J. L., Murillo-Bonilla L. M., Araúz A., Villarreal-Careaga J., Barinagarrementeria F. y Cantú- Brito C. 2011. Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción. *Rev Mex Neuroci* 12: 235-241.
28. Chiquete E., Ruíz-Sandoval J. L., Murillo-Bonilla L. M., Araúz A., Villarreal-Careaga J., León-Jiménez C., Barinagarrementeria F. y Cantú- Brito C. 2012. Egresos por enfermedad vascular cerebral aguda en instituciones públicas del sector salud de México: Un análisis de 5.3 millones de hospitalizaciones en 2010. *Rev Mex Neuroci* 13: 252-258.
29. Choi H.S., Park E.S., Kang H.J., Shin H.Y., Noh C.I., Yun Y.S., Ahn H.S. y Choi J.Y. 2010. Dexrazoxane for preventing anthracycline cardiotoxicity in children with solid tumors. *J Korean Med Sci* 25: 1336-42.

30. Choi K.H., Park M.S., Kim H.S., Kim K.T., Kim H.S., Kim J.T., Kim B.C., Kim M.K., Park J.T. y Cho K.H. 2015. Alpha-lipoic acid treatment is neurorestorative and promotes functional recovery after stroke in rats. *Mol Brain* 8:9.
31. Cholvin T., Loureiro M., Cassel R., Cosquer B., Herbeaux K., de Vasconcelos A.P. y Cassel J.C. 2014. Dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex each contribute to the retrieval of a recent spatial memory in rats. *Brain Struct Funct* DOI 10.1007/s00429-014-0894-6.
32. Colombo M., Fernández T., Nakamura K. y Gross C.G. 1998. Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J Neurophysiol* 80: 1002-5.
33. Couillard-Després S. 2013. Hipocampal neurogénesis and ageing. En: Belzung C. y Wigmore P. (Eds.) *Neurogenesis and neural plasticity*. Londres. Springer.
34. Curtis M.A., Kam M. y Faull R.L. 2011. Neurogenesis in humans. *Eur J Neurosci* 33: 1170-4.
35. del Zoppo G.J., Sharp F.R., Heiss W.D. y Albers G.W. 2011. Heterogeneity in the penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 1836-1851.
36. Deng S., Yan T., Jendry C., Nemecek A., Vincetic M., Gödtel-Armbrust U. y Wojnowski L. 2014. Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer* 14: 842.
37. Deng S., Yan T., Nikolova T., Fuhrmann D., Nemecek A., Gödtel-Armbrust U, Kaina B. y Wojnowski L. 2015. The catalytic topoisomerase II inhibitor dexrazoxane induces DNA breaks, ATF3 and the DNA damage response in cancer cells. *Br J Pharmacol* 172: 2246-57.
38. Dienel G.A. 2014. Lactate shuttling and lactate use as fuel traumatic brain injury: metabolic considerations. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 1736-48.
39. Donovan N.J., Kendall D.L., Heaton S.C., Kwon S., Velozo C.A. y Duncan P.W. 2008. Conceptualizing functional cognition in stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 22: 122-35.

40. Doeppner T.R., Nagel F., Dietz G.P., Weis J., Tonges L., Schwarting S. y Bahr M. 2009. TAT-Hsp70-mediated neuroprotection and increased survival of neuronal precursor cells alter focal cerebral ischemia in mice. *J Cerebral Blood Flow Met* 29: 1187-1196.
41. Dupret D., Revest J.M., Koehl M., Ichas F., De Giorgi F., Costet P., Abrous D.N. y Piazza P.V. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3: e1959.
42. Dwivedi N., Flora G., Kushwaha P. y Flora S.J. 2014. Alpha-lipoic acid protects oxidative stress, changes in cholinergic system and tissue histopathology during co-exposure to arsenic-dichlorvos in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 37: 7-23.
43. Eadie B.D., Zhang W.N., Boehme F., Gil-Mohapel J., Kainer L., Simpson J.M. y Christie B.R. 2009. *Neurobiol Dis* 36: 361-73.
44. Eichenbaum H. 2000. Hippocampus: mapping or memory? *Curr Biol* 10: R785-7.
45. Encinas J.M., Sierra A., Valcárcel-Martín R. y Martín-Suárez S. 2013. A developmental perspective on adult hippocampal neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* 31: 640-5.
46. El-Koussy M., Schroth G., Brenkenfld C. y Arnold M. 2014. Imaging of acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 72: 309-316.
47. Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Nordborg C., Peterson D.A. y Gage F.H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-7.
48. Fan W., Dai Y. Xu H., Zhu X., Cai P., Wang L., Sun C., Hu C., Zheng P. y Zhao B.Q. 2014. Caspase-3 modulates regenerative responses after stroke. *Stem Cells* 32: 473-86.
49. Felice D., O'Leary O.F., Pizzo R.C. y Cryan J.F. 2012. Blockade of the GABAB receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: Relevance to antidepressant action. *Neuropharmacol* 63: 1380-8.
50. Feridooni T., Mac Donald C., Shao D., Yeung P. y Agu R.U. 2013. Cytoprotective potential of anti-ischemic drugs against chemotherapy-induced cardiotoxicity in H9c2 myoblast cell line. *Acta Pharm* 63: 493-503.

51. Fluri F., Schuhmann M.K. y Kleinschnitz. 2015. Animals models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* 9: 3445-54.
52. Fu B., Zhang J., Zhang X., Zhang C., Li Y., Zhang Y., He T., Li P., Zhu X., Zhao Y., Zhang Y. y Wang X. 2014. Alpha-lipoic acid upregulates SIRT1-dependent PGC-1 α expression and protects mouse brain against focal ischemia. *Neurosci* 281: 251-7.
53. Fuentes-Vargas M., Santiago-Mejía J., Pinzon R., Rodríguez R. 2002. Age-related susceptibility to brain ischemia in mice. 2002. *Drug Dev Res* 57: 161-66.
54. Galetta F., Franzoni F., Cervetti G., Regoli F., Fallahi P., Tocchini L., Carpi A., Antonelli A., Petrini M. y Santoro G. 2010. In vitro and in vivo study on the antioxidant activity of dexrazoxano. *Biomed Pharmacother* 64: 259-63.
55. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Franco S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Huffman M.D., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Magid D., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R., Moy C.S., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Schreiner P.J., Sorlie P.D., Stein J., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D. y Woo D., Turner M.B.; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2013. Heart Disease and Stroke Statistics-2013 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 127: e6-e245.
56. Gómez C., Santiago-Mejía J. y Rodríguez R. 1er Congreso Facultad de Medicina "Dr. Roberto Kretchmer" 2005.
57. Gómez C., Santiago-Mejía J., Ventura-Martínez R. y Rodríguez R. 2006. The sunflower seed test: A simple procedure to evaluate forelimb motor dysfunction alter brain ischemia. *Drug Dev Res*, 67: 752-56.
58. Gould E., Reeves A.J., Fallah M., Tanapat P., Gross C.G. y Fuchs E. 1999. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5263-7.
59. Hall E.D., Vaishnav R.A. y Mustafa A.G., 2010. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7: 51-61.
60. Hagan J.J. y Beaughard M. 1990. The effect of forebrain ischaemia on spatial learning. *Behav Brain Res* 41: 151-60.

61. Hansberg-Torres W., 2008. El dióxígeno y sus especies reactivas. En: Konigsberg-Fainstein M. (Ed), Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México, 25-48 pp.
62. Hardas S.S., Sultana R., Clark A.M., Beckett T.L., Szweda L.I., Murphy M.P. y Butterfield D.A. 2013. Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain. *Redox Biol* 30: 80-5.
63. Hartman R.T., Lee J.M., Zipfeld G.J. y Wozniaka D.F. 2005. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1043: 48-56.
64. Hasinoff B.B., Abram M.E., Barnabé N., Allan W.P. y Yalowich J.C. 2001. The catalytic DNA topoisomerase II inhibitor dexrazoxano (ICRF-187) induced differentiation and apoptosis in human leukemia K562 cells. *Mol Pharmacol* 59: 453-61.
65. Hass S., Weidner N. y Winkler J. 2005. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* 18: 59-64.
66. Hawley D.F., Morch K., Christie B.R. y Leasure J.L. 2012. Differential Response of Hippocampal Subregions to Stress and Learning. *PLoS ONE* 7: e53126.
67. Heiss W.D. 2010. The concept of the penumbra: can it be translated to stroke management? *Int J Stroke* 5: 290-295.
68. Heiss W.D. 2011. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 32: 307-320.
69. Heiss W.D. 2012. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci* 1268: 26-34.
70. Hernández-Aguilar D. 2013. Efecto del ambiente enriquecido en las alteraciones del aprendizaje y memoria inducidas por la isquemia cerebral aguda. (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

71. Hughes R.N. 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 497-505.
72. Iadecola C. 1999. Mechanisms of cerebral ischemic damage. En: Walz W (Ed) *Cerebral ischemia*. 1st edición. Human Press. Totowa, New Jersey. Pp. 278.
73. Ichikawa Y., Ghanefar M., Bayeva M., Wu R., Khechaduri A., Naga Prasad S.V., Mutharasan R.K., Naik T.J. y Ardehali H. 2014. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest* 124: 617-30.
74. Imondo A.R., Della-Torre P., Mazué G., Sullivan T.M., Robbins T.L., Hagerman L.M., Podestà y Pinciroli G. 1996. Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. *Cancer Res* 56: 4200-4204.
75. Jaspers R. M. A., Block F., Heim C. y Sontag K.H. 1990. Spatial learning is affected by transient occlusion of common carotid arteries (2VO): comparison of behavioural and histopathological changes after "2VO" and "four-vessel-occlusion" in rats. *Neurosci Lett* 117: 149-153.
76. Jensen L.H., Nitiss K. C., Rose A., Dong J., Zhou J., Hu T., Osheroff N., Jensen P.B., Sehested M., Nittis J.L. 2000. A novel mechanism of cell killing by anti-topoisomerase II bisdioxopiperazines. *J Biol Chem* 275: 2137-46.
77. Kempermann G., Jessberger S., Steiner B. y Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447-52.
78. Kempermann G., Song H. y Gage H. 2015. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: pii: a018812. doi: 10.1101/cshperspect.a018812.
79. Kerner S.G. y Parent J.M. 2010. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37: 267-274.
80. Kessels RPC, de Haan EHF, Kappelle LJ, Postma A. Varieties of human spatial memory: ameta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev* 2001;35: 295-303.

81. Kidd P.M., 2005. Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: nutrients stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Altern Med Rev* 10: 268-293.
82. Kitagawa K. 2012. Ischemic tolerance in the brain: endogenous adaptive machinery against ischemic stress. *J Neurosci Res* 90:1043-54.
83. Kjelstrup K.G., Tuvnes F.A., Steffenach H.A., Murison R., Moser E.I. y Moser M.B. 2002. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10825-30.
84. Krafft P.R., Bailey E.L., Lekic T., Rolland W.B., Altay O., Tang J., Wardlaw J.M., Zhang J.H. y Sudlow C.L.M. 2012. Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke* 7: 398-406.
85. Kronenberg G., Bick-Sander A., Bunk E., Wolf C., Ehninger D. y Kempermann G. 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging* 27: 1505-13.
86. Lakhan S.E., Kirchgessner A. y Hofner M. 2009. Inflammatory mechanism in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Translational Med* 7:97.
87. Landgren H. y Curtis M.A. 2011. Locating and labeling neural stem cells in the brain. *J Cell Physiol* 226: 1-7.
88. Langer S. W. 2014. Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects. *Cancer Manag Res* 6: 357-63.
89. Langhorne P., Coupar F. y Pollock A. 2009. Motor recovery after stroke: a systematic review. *Lancet Neurol* 8: 741-54.
90. Langhorne P., Bernhardt J. y Kwakkel G. 2011. Stroke rehabilitation. *Lancet* 377: 1693-702.
91. Lapi D. y Colantuoni A. 2015. Remodeling of cerebral microcirculation after ischemia-reperfusion. *J Vasc Res* 52: 22-31.

92. Lipshultz S.E., Scully R.E., Lipsitz S.R., Sallan S.E., Silverman L.B., Miller T.L., Barry E.V., Asselin B.L., Athale U., Clavell L.A., Larsen E., Moghrabi A., Samson Y., Michon B., Schorin M.A., Cohen H.J., Neuberg D.S., Orav E.J. y Colan S.D. 2010. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol* 11: 950-61.
93. Lloyd-Jones D., Adams R.J., Brown T.M., Carnethon M., Dai S., De Simone G., Ferguson T.B., Ford E., Furie K., Gillespie C., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S., Ho P.M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M.M., Meigs J., Mozaffarian D., Mussolino M., Nichol G., Roger V., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Wong N.D. y Wylie-Rosett J. 2010. Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: e46-e215.
94. Luo C.X., Jiang J., Zhou Q.G., Zhu X.J., Wang W., Zhang Z.J., Han X. y Zhu D.Y. 2007. Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res* 85: 1637-46.
95. Mackay J., Mensah G.A., Mendis S. y Greenlund K. 2004. World Health Organization. The Atlas of Heart Disease and Stroke. Geneva: World Health Organization. Pp. 112.
96. Macrae I.M. 2011. Preclinical stroke research – advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischemia. *Br J Pharmacol* 164: 1062-1078.
97. Magistretti P.J. 1999. Brain Energy Metabolism. En: Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L. y Squire L.R., eds. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press. Pp 389-413.
98. Martínez H.R., Rangel-Guerra R.A., Marfil-Rivera A. et al. 1995. Cost of stroke in Mexico. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 5: 244-247.
99. Maliszka K.L. y Hasinoff B.B. 1996. Inhibition of anthracycline semiquinone formation by ICRF-187 (dexrazoxane) in cells. *Free Radical Biol Med* 20: 905-14.
100. Manzanero S., Erion J.R., Santro T., Steyn F., Chen C., Arumugam T.V. y Stranahan A.M. 2014. Intermittent fasting attenuates increases in neurogenesis after ischemia and reperfusion and improves recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 897-905.

101. Maviel T., Durkin T.P., Menzaghi F. y Bontempi B. 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305: 96-9.
102. McBean D.E. y Kelly P.A. 1998. Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmacol* 30: 431-4.
103. Ming G. y Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687-702.
104. Minhas G., Modgil S. y Anand A. 2014. Role of iron in ischemia-induced neurodegeneration: mechanisms and insights. *Metab Brain Dis* 29: 583-91.
105. Morris R. 1984. Developments of water-maze procedures for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
106. Moskowitz M.A., Lo E.H. y Iadecola C. 2010. The science of stroke mechanism in search of treatment. *Neuron* 67: 181-198.
107. Muthuswamy A.D., Vedagiri K., Ganesan M. y Chinnakannu P. 2006. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid. *Clin Chim Acta* 368: 84-92.
108. Nelson A., Lebessi A., Sowinski P. and Hodges H. 1997. Comparison of effects of global ischemia on spatial learning in the standard and radial water maze: Relationship of hippocampal damage to performance. *Behav Brain Res* 85: 93-116.
109. Nieto-de Pascual R.H., Guízar-Bermúdez C. y Ortiz-Trejo J.F. 2003. Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en el Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex* 66:7-12.
110. Niv F., Keiner S., Krishna-K., Witte O.W., Lie D.C. y Redecker C. 2012. Aberrant neurogenesis after stroke a retroviral cell labeling study. *Stroke* 43: 2468-75.
111. Nunn J. A., LePeillet E., Netto C. A., Hodges H., Gray J. A. y Meldrum B. S. 1994. Global ischemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze. *Behav. Brain Res* 62: 41-54.

112. O'Leary O.F., O'Connor R.M. y Cryan J.F. 2012. Lithium-induced effects on adult hippocampal neurogenesis are topographically segregated along the dorso-ventral axis of stressed mice. *Neuropharmacol* 62: 247-55.
113. O'Leary O.F. y Cryan J.F. 2014. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along dorsoventral axis. *Trends Pharmacol Sci* 35: 675-87.
114. Oz M., Demir E.A., Caliskan M., Mogulkoc R., Baltaci A.K. y Nurullahoglu Atalik K.E. 2014. 3', 4'-Dihydroxyflavonol attenuates spatial learning and memory impairment in global cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* DOI: 10.1179/1476830514Y.0000000159.
115. Paciaroni M., Caso V. y Agnelli G. 2009. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol* 61: 321-330.
116. Parent JM. 2003. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 9: 261-272.
117. Park S., Karunakaran U., Jeoung N.H., Jeon J.H. y Lee I.K. 2014. Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid. *Curr Med Chem* 21: 3636-45.
118. Paul S.L., Srikanth V.K. y Thrift A.G. 2007. The large and growing burden of stroke. *Curr Drug Targets* 8: 78-93.
119. Pierson J.L., Pullins S.E. y Quinn J.J. 2015. Dorsal hippocampus infusions of CNQX into the dentate gyrus disrupt expression of trace fear conditioning. *Hippocampus* 25: 779-85.
120. Pohjasvaara T., Erkinjuntti T., Vataja R. y Kaste M. 1997. Comparison of stroke features and disability in daily life in patients with ischemic stroke aged 55 to 70 and 71 to 85 years. *Stroke* 28: 729-735.
121. Pohjasvaara T., Erkinjuntti T., Vataja R. y Kaste M. 1997b. Dementia three months after stroke. Baseline frequency and effect of different definitions of dementia in the Helsinki Stroke Aging Memory Study (SAM) cohort. *Stroke* 28: 785-792.

122. Popelová O., Štěřba M., Hašková P., Šimůnek T., Hroch M., Gunčová I., Nachtigal P., Adamcová M., Geršl V. y Mazurová Y. 2009. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br J Cancer* 101: 792-802.
123. Pulsinelli W.A. y Brierley J.B. 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-72.
124. Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A.S., McNamara J.O., White L.E. *Neuroscience*. 4a ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2007.
125. Qu H.L., Zhao M., Zhao S.S., Xiao T., Song C.G., Cao Y.P., Jolkkonen J. y Zhao C.S. 2015. Forced limb-use enhanced neurogenesis and behavioral recovery after stroke in the aged rats. *Neurosci* 286: 316-24.
126. Quintard H., Borsotto M., Veysiere J., Gandin C., Labbal F., Widmann C., Lazdunski M. y Heurteaux C. 2011. MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacol* 61: 622-31.
127. Ramírez-Rodríguez G., Laguna-Chimal J., Vega-Rivera N.M., Ortiz-López L., Méndez-Cuesta L., Estarada-Camarena E.M. 2011. Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. *Salud Mental* 34: 497-506.
128. Ramos J.M. 2000. Long-term spatial memory in rats with hippocampal lesions. *Eur J Neurosci* 12: 3375-84.
129. Rao V. A. 2013. Iron chelators with topoisomerase-inhibitory activity and their anticancer applications. *Antioxidants Redox Signaling* 18: 930-55.
130. Richard M.J.P., Connell B.J., Khan B.V. y Saleh T.M. 2011. Cellular mechanisms by which lipoic acid confers protection during the early stages of cerebral ischemia: A possible role for calcium. *Neurosci Res* 69: 299-307.
131. Rink C. y Khanna S. 2011. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiol Genomics* 43: 521-528.
132. Rockwood K., Wentzel C., Hachinski V., Hogan D.B., MacKnight C. y McDowell I. 2000. Prevalence and outcomes of vascular cognitive impairment. *Vascular cognitive*

impairment investigators of the Canadian study of health and aging. *Neurology* 54: 447-451.

133. Rodríguez R., Rodríguez-Boscan I., Lugo-Sira D., Vidrio H., Hong E., Medina M. y Herrera I. 2000a. Bilateral sequential common carotid artery sectioning in mice as a new model for testing neuroprotective drugs. *J Stroke Cerebrovascular Dis* 9: 45-53.

134. Rodríguez R., Gerson R. Santiago-Mejía J. 2000b. Dexrazoxane-induced reduction in mortality in mice subject to severe forebrain ischemia. *Drug Dev Res* 51: 149-152.

135. Rodríguez R. Santiago-Mejía J., Fuentes-Vargas M. y San-Juan E.R. 2003. Outstanding neuroprotective efficacy of dexrazoxane in mice subjected to sequential common carotid artery sectioning. *Drug Dev Res* 60: 294-302.

136. Rodríguez R., Santiago-Mejía J., Gómez C. y Ramírez-San Juan E. 2005. A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice. *J Neurosci Methods* 147: 22-28.

137. Rolando C. y Taylor V. 2014. Neural stem cell of the hippocampus: development, physiology regulation, and dysfunction in disease. *Curr Top Dev Biol* 107: 183-206.

138. Rosell A. 2007. Modelos in vivo e in vitro de isquemia cerebral. En: Montaner J. (Ed). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. 1ra edición. ICG Marge. Barcelona, España. Pp. 202.

139. Rossi D.J., Brady J.D. y Mohr C. 2007. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10: 1377-86.

140. Roti-Roti E.C. y Salih M. 2012. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced injury in mouse ovarian cells. *Biol Reproduction* 86: 1-11.

141. Sahay A., Scobie K.N., Hill A.S., O'Carroll C.M., Kheirbek M.A., Burghardt N.S., Fenton A.A., Dranovsky A. y Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472: 466-470.

142. Sanai N., Tramontin A.D., Quiñones-Hinojosa A., Barbaro N.M. Gupta N., Lawton M.T., McDermott M.W., Parsa A.T., Manuel-García Verdugo J. y Berger M.S. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427: 740-4.

143. Santiago-Mejía J., Fuentes-Vargas M., Rios C., Vidrio H. y Rodríguez R. 2004. Effect of ascorbic acid, dihydrolipoic acid, t-butylhydroquinone, and phenylbutylnitron on mortality and neurological impairment induced by sequential common carotid artery sectioning in mice. *Drug Development Res* 63: 212-8.
144. Santiago-Mejía J. Efecto neuroprotector de los antioxidantes en un modelo de isquemia cerebral aguda (Tesis inédita de doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
145. Sayre L.M., Perry G. y Smith M.A., 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21: 172-188.
146. Scharfman H.E. 2007. The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163: 627-37.
147. Schmidt-Kastner R., Paschen W., Ophoff B.G. y Hossmann K.A. 1989. A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20: 938-46.
148. Schurr A. 2006. Lacate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 142-52.
149. Seifert C.F., Nesser M.E. y Thompson D.F. 1994. Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Ann Pharmacother* 28: 1063-72.
150. Selim M.H. y Ratan R.R. 2004. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Res Rev* 3: 345- 53.
151. Sepe D.M., Ginsberg J.P. y Balis F.M. 2010. Dexrazoxane as a cardioprotectant in children receiving anthracyclines. *Oncologist* 15: 1220-6.
152. Shang Y., Cheng J., Qi J. y Miao H. 2005. Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 67-73.
153. Shila S., Kokilavani V., Subathra M. y Panneerselvam C. 2005. Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology* 210: 25-36.

154. Shih P.C., Yang Y.R. y Wang R.Y. 2013. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One* 8: e78163.
155. Šimůnek T., Stěrba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R. y Gersl V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacology Reports* 61: 154-171.
156. Smith A.L., Hill C.A., Alexander M., Szalkowski C.E., Chrobak J.J., Rosenkrantz T.S. y Fitch R.H. 2014. Spatial working memory deficits in male rats following neonatal hypoxic ischemic brain injury can be attenuated by task modifications. *Brain Sci* 4: 240-72.
157. Snell R. 2010. *Neuroanatomía clínica*. EUA. Editorial Médica Panamericana.
158. Snyder J.S., Soumier A., Brewer M., Pickel J. y Cameron H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress response and depressive behaviour. *Nature* 476: 458-61.
159. Soares L.M., Schiavon A.P., Milani H. y de Oliveira R.M. 2013. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Behav Brain Res* 249: 28-37.
160. Spaccapelo L., Galantucci M., Neri L., Contri M., Pizzala R., D'Amico R., Ottani A., Sandrini M., Zaffe D., Giuliani D. y Guarini S. 2013. Up-regulation of the canonical Wnt-3^a and Sonic hedgehog signaling underlies melanocortin-induced neurogenesis after cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 707: 78-86.
161. Spagnuolo R.D., Recalcati S., Tacchini L. y Cairo G. 2011. Role of hypoxia-inducible factors in the dexrazoxane-mediated protection cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity. *PLoS One* 6: 299-312.
162. Squire L., Berg D., Bloom F., du Lac S., Ghosh A., Spitzer N. *Fundamental neuroscience*. 3a ed. San Diego:Academic Press; 2008.
163. Štěrba M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Gerš V. y Šimůnek T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. 2013. *Antioxid Redox Signal* 18: 899-929.

164. Strange B.A., Witter M.P., Lein E.S. y Moser E.I. 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 15:655-69.
165. Sun F., Wang X., Mao X., Xie L. y Jin K. 2012. Ablation of neurogenesis attenuates recovery of motor function after focal cerebral ischemia in middle-aged mice. *PLoS ONE* 7: e46326.
166. Sun F., Qi X., Geng C. y Li X. 2015. Dexrazoxane protects breast cancer patients with diabetes from chemotherapy- induced cardiotoxicity. *Am J Med Sci* 349: 406-12.
167. Sun X., Sun X., Liu T., Zhao M., Zhao S., Xiao T., Jolkkonen J. y Zhao C. 2015. Fluoxetine enhanced neurogenesis is not translated to functional outcome in stroke rats. *Neurosci Lett* 603: 31-6.
168. Surget A., Tanti A., Leonardo E.D., Laugeray A., Rainer Q., Touma C., Palme R., Griebel G., Ibarguen-Vargas Y., Hen R. y Belzung C. 2011. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. 2011. *Mol Psychiatry* 16: 1177-88.
169. Sutherland B.A., Minnerup J., Balami J.S., Arba F., Buchan A.M. y Kleinschnitz C. 2012. *Int J Stroke* 7: 407-18.
170. Tajiri N., Dailey T., Metcalf C., Mosley Y. I., Lau T., Staples M., van Loveren H., Kim S. U., Yamashima T., Yasuhara T., Date I., Kaneko Y. y Borlongan C.V. 2013. In vivo animal stroke models: a rationale for rodent and non-human primate models. *Transl Stroke Res* 4: 308-21.
171. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J. y Teasdale G.M. 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53:60.
172. Tan Y.F., Preston E. y Wojtowics J.M. 2010. Enhanced post ischemic neurogenesis in aging. *Front Neurosci* 30: 163.
173. Tan S.Z.K., Ganella D.E., Lindsay A., Dick W., Duncan J.R., Ong-Palsson E., Bathgate R.A.D., Kim J.H. y Lawrence A.J. 2015. Spatial learning requires mGlu5 signalling in the dorsal hippocampus. *Neurochem Res* 40: 1303-1310.

174. Tatemichi T.K., Desmond D.W., Stem Y., Paik M., Sano M. y Bagiella E. 1994. Cognitive impairment after stroke: frequency, patterns, and relationship to functional abilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57: 202-207.
175. Thiel A., Cechetto D.F., Heiss W.D., Hachinski V. y Whitehead S.N. 2014. Amyloid Burden, neuroinflammation, and links to cognitive decline after ischemic stroke. *Stroke* 45: 2825-29.
176. Thompson B. J. y Ronaldson P.T. 2014. Drug delivery to the ischemic brain. *Adv Pharmacol* 71: 165-202.
177. Torregrosa G., Salom J.B., Tover-Mengual T. y Alborch E. 2007. Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En: Montaner J. (Ed). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. 1ra edición. ICG Marge. Barcelona, España. Pp. 202.
178. Trendelenburg G. 2014. Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 1857-67.
179. Trivedi M.A. y Coover G.D. 2004. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiol Learn Mem* 81: 172-84.
180. Tronel S., Charrier V., Sage C., Maitre M., Leste-Lasserre T. y Abrous D.N. 2015. Adult-born dentate neurons recruited in both spatial memory encoding and retrieval. *Hippocampus* doi: 10.1002/hipo.22468.
181. Tsai Y.W., Yang Y.R., Sun S.H., Liang K.C. y Wang R.Y. 2013. Post ischemia intermittent hypoxia induces hippocampal neurogenesis and synaptic alterations and alleviates long-term memory impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 764-73.
182. Uchida K., Nakamura S., Kobayashi T. y Machida T. 2005. Topographic analysis of cell proliferation in the hippocampus of the adult mouse. *NeuroReport* 16: 2033-6.
183. van Praag H., Kempermann G. y Gage F.H. 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1: 191-8.
184. Vavrova A., Jansova H., Mockova E., Mahacek M., Haskova P., Tichotova L., Sterba M. y Simunek T. 2013. Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PLoS ONE* 8: e76676.

185. Veskovic M., Mladenovic D., Jorgacevic B., Stevanovic I., de Luka S. y Radosavljevic T. 2015. Alpha-lipoic acid affects the oxidative stress in various brain structures in mice with methionine and choline deficiency. *Exp Biol Med* 240: 418-25.
186. von Bohlen Und Halbach. 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329: 409-20.
187. Vukovic J., Blackmore D.G., Jhaveri D. y Bartlett P.F. 2011. Activations of neural precursors in the adult neurogenic niches. *Neurochem Int* 59: 341-6.
188. Wan L., Cheng Y., Luo Z., Guo H., Zhao W., Gu Q., Yang X., Xu J., Bei W. y Guo J. 2015. Neuroprotection, learning and memory improvement of a standardized extract from Renshen Shouwu against neuronal injury and vascular dementia in rats with brain ischemia. *J Ethnopharmacol* 165: 118-26.
189. Wang C., Zhang M., Sun C., Cai Y., You Y., Huang L. y Liu F. 2011. Sustained increase in adult neurogenesis in the rat hippocampal dentate gyrus after transient brain ischemia. *Neurosci Lett* 488: 70-5.
190. Waxman S. 2011. *Neuroanatomía clínica*. Inglaterra. McGrawHill.
191. Weilinger N.L., Maslieieva V., Bialecki J., Sridharan S.S., Tang P.L. y Thompson R.J. 2013. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacol Sin* 34: 39-48.
192. Weimer J.M. y Anton E.S. 2006. Doubling up on microtubule stabilizers: synergistic functions of doublecortin-like kinase and doublecortin in the developing cerebral cortex. *Neuron* 49: 3-4.
193. Willshaw D.J. y Buckingham J.T. 1990. An assessment of Marr's theory of the hippocampus as a temporary memory store. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 329: 205-15.
194. Wiseman L.R. y Spencer C.M. 1998. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs* 56: 385-403.

195. World Health Organization. 2008. The global burden of disease 2004.
196. World Health Organization, 2014. World Health Organization. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva.
197. Xiang P., Deng H.Y., Li K., Huang G.Y., Chen Y., Tu L., Ng P.C., Pong N.H., Zhao H., Zhang L. y Sung R.Y. 2009. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol* 63: 343-9.
198. Xing C., Arai K., Lo E.H. y Hommel M. 2012. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 7:378-85.
199. Yang Y., Zhang M., Kang X., Jiang C., Zhang H., Wang P. y Li J. 2015. Impaired adult hippocampal neurogenesis and cognitive ability in a mouse model of intrastriatal hemorrhage. *Neurosci Lett* 599: 133-9.
200. Zatloukalová L., Filipský T., Mladěnka P., Semecký V., Macáková K., Holečková M., Vávrová J., Palicka V. y Hrdina R. 2012. Dexrazoxane provided moderate protection in a catecholamine model of severe cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 90: 473-84.
201. Zhang J., Zhao Y. y Zhao B. 2010. Scavenging effects of dexrazoxane on free radicals. *J Clin Biochem Nutr* 47: 238-245.
202. Zhang X., Huang G., Liu H., Chang H. y Wilson J.X. 2012. Folic acid enhances Notch signaling, hippocampal neurogenesis, and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* 15: 55-61.
203. Zhang Z., Wang H., Jin Z., Cai X., Gao N., Cui X., Liu P., Zhang J., Yang S. y Yang X. 2015. Downregulation of surviving regulates adult hippocampal neurogenesis and apoptosis, and inhibits spatial learning and memory following traumatic brain injury. *Neurosci* 300: 219-28.
204. Zhao C., Deng W. y Gage F.H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645-60.
205. Zhao X., Zhang H., Guo J. y Zhang Y. 2013. The effects of bilateral common carotid artery occlusion on expression of peripherin and choline acetyltransferase activity in C57BL/6 mice. *Brain Res* 1491:167-75.

206. Zhou L., Sung R.Y.T., Li K., Pong N.H., Xiang P., Shen J., Ng P.C. y Chen Y. 2011. Cardioprotective effect of dexrazoxane in a rat model of myocardial infarction: anti-apoptosis and promoting angiogenesis. *Int J Cardiol* 152: 196-201.