



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio *in vitro* del papel neuroprotector del factor de
crecimiento vascular endotelial ante mecanismos de
muerte neuronal relevantes en la isquemia cerebral**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ANDRÉS PENAGOS PUIG



**DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 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.

Contenido

Agradecimientos académicos	4
Resumen	6
Índice de abreviaturas.....	7
Introducción	8
Isquemia cerebral	8
Mecanismos de muerte neuronal en la progresión de la cascada isquémica	10
<i>Fallo energético y necrosis</i>	11
<i>Excitotoxicidad</i>	13
<i>Estrés oxidante</i>	19
<i>Apoptosis</i>	22
El factor de crecimiento vascular endotelial	24
Planteamiento del problema	28
Hipótesis.....	29
Objetivo general	30
Objetivos particulares.....	30
Diseño experimental.....	31
Cultivo primario de neuronas corticales.....	31
Tratamientos.....	31
Modelo de excitotoxicidad	32
Modelo de estrés oxidante.....	32
Modelo de muerte apoptótica.....	32
Privación de factores tróficos.....	32
Evaluación de la viabilidad celular por microscopía confocal.....	33
Evaluación de la actividad metabólica	33
Conteo de espinas dendríticas	34
Inmunocitoquímica	34
Resultados	36
Expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en neuronas corticales.....	36
VEGF evita parcialmente la muerte provocada por la privación de factores tróficos en cultivos de neuronas corticales.....	37
VEGF reduce la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad	38

El VEGF no evita la muerte neuronal inducida por HNE.....	40
VEGF no evita la muerte neuronal inducida por la incubación con estaurosporina.	42
El NMDA y el HNE en condiciones subletales inducen una disminución en la densidad de espinas dendríticas.	44
Discusión.....	47
Señalización de VEGF en neuronas corticales <i>in vitro</i>	48
Efecto de VEGF sobre la excitotoxicidad ocasionada por NMDA.....	49
Efecto de VEGF en el contexto de estrés oxidante, implicaciones para su efecto neuroprotector	50
VEGF y la muerte neuronal apoptótica inducida por estaurosporina.....	51
Conclusiones	52
Referencias.....	53

Agradecimientos académicos

Este proyecto fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (219542) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (IA201315). Para la realización de este trabajo de tesis se contó con una beca de PAPIIT-DGAPA (IA201315) por 6 meses.

Agradezco la asistencia técnica de la Dra. Ruth Rincón Heredia en los experimentos de microscopía confocal, de la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro y del personal académico del bioterio y la unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco al Dr. Luis Tovar por permitirme incorporarme al laboratorio y desarrollar este trabajo bajo su dirección. Agradezco su paciencia y compromiso, las discusiones y consejos sinceros, bien intencionados que fueron parte de mi formación académica. A todos los miembros del laboratorio AL-305. A Cristi y Marina, quienes con su trabajo hacen posible nuestro crecimiento. A mis compañeros Aura, Isaac, Alfredo, Alberto, Yessica, Fernando, Edgar, Moisés y Bere por tantas horas en el laboratorio y fuera de él que casi no se sintieron gracias a su disponibilidad a ser felices, a reírnos de nosotros mismos. Los quiero muchísimo. A Ruth por compartir conmigo su amor a la ciencia y cobijarme bajo su cuidado.

A las ratitas que me han permitido trabajar. Tengo con ustedes una gran deuda y una gran responsabilidad. Son héroes que no han de pasar desapercibidos.

A los revisores de mi trabajo, los doctores Ricardo Tapia, Luz Navarro, Ana María López Colomé y Rocío Salceda.

Por último, a la Universidad. Por su calidez y por ser un refugio. Por brindar a manos llenas y sin recelo la oportunidad de ver más allá. Por convertirse de manera inevitable en parte irrefutable de mi identidad.

Resumen

El infarto isquémico cerebral consiste en la interrupción del aporte sanguíneo al parénquima cerebral, lo que genera la pérdida de la viabilidad del tejido y la progresión de un grupo complejo de procesos bioquímicos que expanden el daño inicial. La eficiencia de los tratamientos actuales es limitada por lo que la búsqueda de agentes neuroprotectores que eviten la muerte de las neuronas dentro de la zona del infarto ha adquirido relevancia en los últimos años. Existe evidencia en modelos experimentales *in vivo* que apunta al factor de crecimiento vascular endotelial como un agente neuroprotector. En este trabajo se evaluó el efecto de la administración de este factor en cultivos primarios de neuronas corticales expuestas a estímulos de excitotoxicidad, estrés oxidante e inducción de muerte apoptótica. Se encontró que las neuronas corticales tienen los receptores específicos para el factor de crecimiento vascular endotelial 1 y 2, además de responder a la exposición a dicho factor. Esta estimulación evita la muerte neuronal y la pérdida de espinas dendríticas mediada por excitotoxicidad pero no ante un estímulo oxidante. Estos hallazgos implican que el factor de crecimiento vascular endotelial tiene un efecto neuroprotector sobre la muerte por excitotoxicidad glutamatérgica pero no ante el estrés oxidante.

Índice de abreviaturas

[Ca²⁺]_i: Concentración intracelular de calcio
Akt: Proteína cinasa B1
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionato
Bcl-2: Proteína del linfoma de células B-2
BSA: Albúmina de suero bovino
DAPK1: Proteína cinasa asociada a muerte celular 1
DIV: Días *in vitro*
EAAT: Transportador de aminoácidos excitadores
ECV: Evento cerebro vascular
EthD-1: Homodímero de etidio
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HIF-1: Factor inducible por hipoxia
HNE: 4-hidroxinonenal
MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NCX: Intercambiador de Na⁺/Ca²⁺
NMDA: N-metil D-aspartato
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NOX : NADPH-oxidasa
PARP: Poli ADP-ribosa polimerasa
PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa
PLC: Fosfolipasa C
PLGF: Factor de crecimiento placentario
PSD-95: Proteína de la densidad postsináptica 95
PBS: Buffer de fosfatos salino
ROS: Especies reactivas de oxígeno
STS: Estaurosporina
VDCC: Canal de calcio dependiente de voltaje
VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

Introducción

Isquemia cerebral

El infarto cerebral isquémico es la disminución transitoria de la irrigación sanguínea del tejido cerebral como resultado de la obstrucción de alguna de las arterias encargadas del aporte sanguíneo al cerebro, lo que conduce a afectaciones celulares inicialmente circunscritas al área irrigada por la arteria obstruida. En la mayoría de los casos es producido por la aterotrombosis de arterias cervicales o intracraneales, cardioembolismo o la oclusión de pequeños vasos cerebrales, otras causas menos comunes incluyen coagulopatías, vasculitis y desórdenes hematológicos (Brouns y De Deyn, 2009; Grau et al., 2001). Según datos de la Organización Mundial de la Salud anualmente cerca de 6.7 millones de personas mueren a causa de un infarto cerebral isquémico (OMS, 2014). Para 2015 los eventos cerebro vasculares (ECV) constituyeron la sexta causa de muerte en México (Instituto Nacional de Estadística y Geografía ([INEGI], 2015), de los cuales el infarto cerebral isquémico, cuya tasa de mortalidad ha incrementado en la última década (Chiquete et al., 2011), representa el ECV con mayor incidencia en adultos menores de 65 años (Cantú-Brito et al., 2011).

Algunos estudios sugieren que las diferentes causas del evento isquémico se asocian con factores de riesgo particulares. La edad avanzada e historial de enfermedades cardiovasculares se relacionan con obstrucciones causadas por embolismo mientras que la hipertensión, tabaquismo, hipercolesterolemia y ataques isquémicos transitorios previos incrementan el riesgo de sufrir un infarto de tipo trombótico (Grau et al., 2001; Sacco et al., 1997).

El grado de recuperación funcional después del evento isquémico es diverso y únicamente se ha demostrado la efectividad limitada de un reducido número de tratamientos farmacológicos y quirúrgicos, entre ellos la administración temprana de antiagregantes plaquetarios (Jauch et al., 2013), la eliminación mecánica del trombo causante de la oclusión (Powers et al., 2015) y la aplicación de terapias trombolíticas (Demchuk et al., 1999). Sin embargo, la eficiencia de estos tratamientos depende en gran medida de la rapidez de la atención médica.

En México el único tratamiento contemplado en las Guías de Práctica Clínica de la Secretaría de Salud es la administración intravenosa dentro de las primeras 3 horas después del infarto de alteplasa (Rivera et al., 2008), una forma recombinante del activador tisular de plasminógeno implicada en la degradación de coágulos sanguíneos (Wardlaw et al., 2012). No obstante, la corta ventana terapéutica y el riesgo que supone al incrementar la probabilidad de sufrir complicaciones hemorrágicas hace que únicamente entre 2-8% de los pacientes reciban el activador de plasminógeno (Reeves et al., 2005).

Dicha limitante ha hecho evidente la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos con enfoques terapéuticos diferentes, entre los cuales la neuroprotección ha sido objeto de estudios clínicos que buscan aminorar el daño ocasionado en la fase temprana del infarto (Lyden et al., 2002; Saver et al., 2015) o la lesión posterior ocasionada durante la restauración del flujo sanguíneo (Fagan et al., 2010; Switzer et al., 2011).

Mecanismos de muerte neuronal en la progresión de la cascada isquémica

La serie de eventos bioquímicos que suceden posterior al evento isquémico, denominada cascada isquémica (Fig. 1), constituye un proceso dinámico que inicia desde los primeros minutos de isquemia y puede prolongarse por horas o días (Schwamm et al., 1998). De acuerdo con la severidad de la disminución de la perfusión sanguínea pueden distinguirse dos zonas dentro del área del tejido afectado. El foco isquémico corresponde a la región sometida a hipoxia severa y fallo energético, caracterizada por la rápida muerte del tejido en una forma predominantemente necrótica (Benchoua et al., 2001). En contraste, la zona de penumbra se ubica en la región de la lesión isquémica en donde el flujo sanguíneo colateral puede mantener la demanda energética y de oxígeno, así como la integridad celular, durante un tiempo limitado (Beretta et al., 2015). El daño infligido sobre la zona de penumbra por el evento isquémico es considerado reversible, sin embargo, a medida que el infarto progresa se echan a andar mecanismos moleculares e inflamatorios que pueden agravar la lesión inicial y conducir a la pérdida irreversible de la viabilidad del tejido (Kulik et al., 2000; McCann et al., 2008) seguidos por procesos de neurogénesis y regeneración axonal (Duan et al., 2015; Li et al., 2015; Shen et al., 2010).

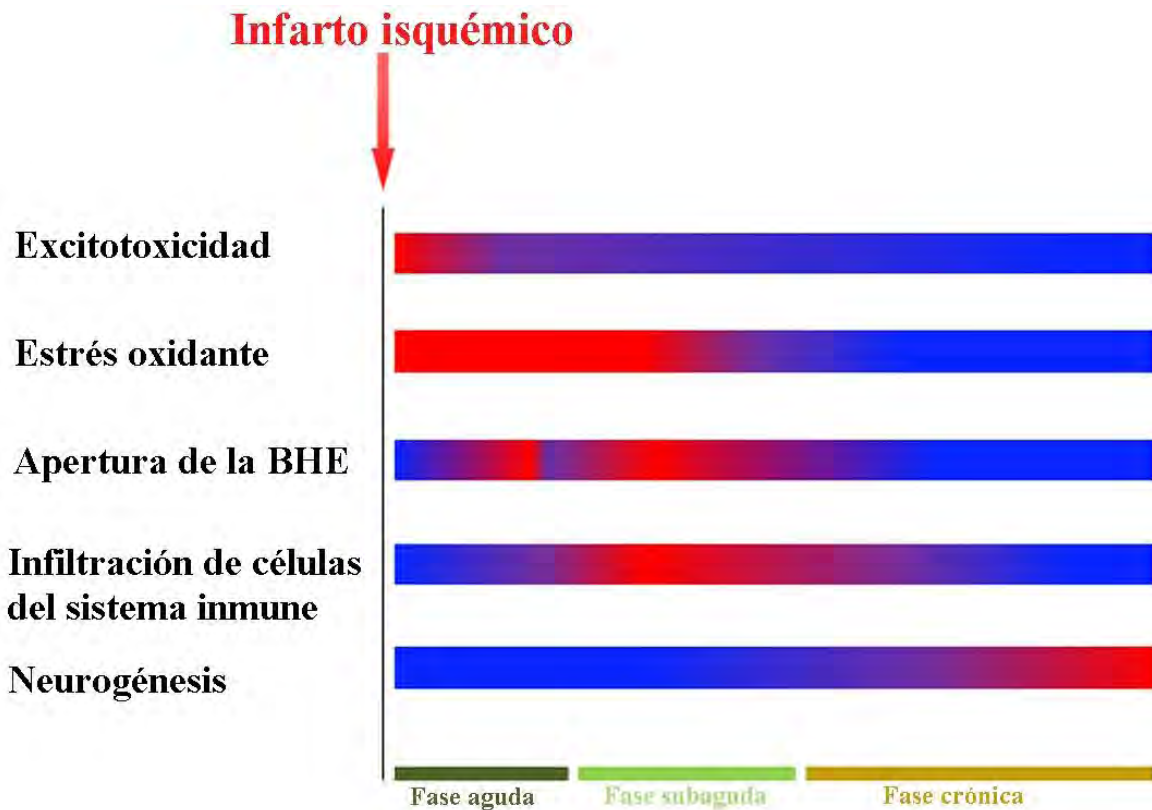


Figura 1. Evolución espaciotemporal de la lesión isquémica. Representación esquemática de los eventos moleculares heterogéneos que suceden después del infarto isquémico, en azul se representa la condición basal de los diferentes parámetros y en rojo el pico de las alteraciones. Modificado de (Tovar-y-Romo et al., 2016).

Fallo energético y necrosis

El cerebro depende casi exclusivamente del suministro constante de glucosa para satisfacer su alta demanda energética, sin embargo, es capaz de utilizar lactato o cuerpos cetónicos como sustratos energéticos después del ejercicio o periodos de inanición (Maurer et al., 2011; van Hall et al., 2009). El mantenimiento de potenciales de reposo, sinápticos y la propagación de potenciales de acción representa un costo metabólico elevado para las neuronas sostenido por una tasa alta de fosforilación oxidativa y baja tasa glucolítica (Alle et al., 2009; Itoh et al., 2003). En contraste, los astrocitos sustentan a través de un metabolismo principalmente glucolítico el reciclamiento del neurotransmisor excitador

glutamato a través del ciclo glutamina-glutamato (Fig.2). (Schousboe et al., 2014). Además, la presencia de un gradiente de lactato desde astrocitos hacia neuronas provee un sustrato energético adicional (Itoh et al., 2003; Machler et al., 2016).

En los primeros minutos del infarto isquémico se presenta una caída abrupta en los niveles de ATP en el cerebro (Palmer et al., 1990). La respuesta metabólica en astrocitos, mediada por la fosforilación y activación del sensor energético cinasa activada por monofosfato de adenina, consiste en incrementar el transporte de glucosa y la síntesis glucolítica de ATP, así como la β -oxidación de ácidos grasos (Almeida et al., 2004). Por otra parte, las neuronas son virtualmente incapaces de aumentar su tasa glucolítica dada la constante degradación de la enzima fosfofructocinasa-2 y utilizan la glucosa a través de la vía del fosfato de pentosas para producir agentes antioxidantes (Herrero-Mendez et al., 2009). Alteraciones en la eficiencia de esta vía junto con la limitada capacidad de consumir energía procedente del metabolismo de los ácidos grasos hacen que las neuronas sean particularmente sensibles al estrés oxidante y fallo energético (Cao et al., 2015; Schonfeld y Reiser, 2013).

El estado metabólico comprometido del tejido conduce a la acidificación del medio intracelular así como a la falla de los mecanismos responsables de mantener el potencial de membrana. La activación de la isoforma 1 del regulador de pH intercambiador de Na^+/H^+ y la disminución en la actividad de la bomba de Na^+/K^+ provocan la despolarización de las neuronas del foco isquémico (Manhas et al., 2010; Muller y Somjen, 2000; Yang et al., 1992). Exacerbada por el posterior flujo de Na^+ hacia el compartimento intracelular a través de canales dependientes de voltaje y receptores ionotrópicos de glutamato (Muller y Somjen, 2000), esta despolarización puede propagarse hacia la zona circundante al infarto

y contribuir al agravamiento de la lesión incluso después de restaurar el flujo sanguíneo (Hartings et al., 2003; Tanaka et al., 1997).

La pérdida del potencial de membrana está acompañada por la entrada y acumulación de iones de Ca^{2+} al interior de la células ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) a través de canales dependientes de voltaje (Stanika et al., 2012). Además, la inversión del gradiente de Na^+ altera la función del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) lo que contribuye a incrementar los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Kintner et al., 2010) y a la activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} como las calpainas, principales responsables del componente necrótico en el foco isquémico (Yamashima et al., 2003). Aunque los niveles de ATP en el parénquima cerebral se recuperan parcialmente pocos minutos después del inicio de la reperfusión (Marcy y Welsh, 1984) las alteraciones en la homeostasis iónica y metabólicas desencadenadas durante el fallo energético tienen fuertes implicaciones que pueden permanecer durante el periodo de reperfusión cuando la actividad mitocondrial está potenciada (Gellerich et al., 2012; Lang-Rollin et al., 2003).

Excitotoxicidad

La acumulación de glutamato en el parénquima cerebral genera la sobreactivación de receptores en las neuronas y empeora el estado del tejido isquémico a través de un proceso neurodegenerativo denominado excitotoxicidad que acelera la muerte necrótica de las células del foco isquémico y activa el programa apoptótico en neuronas metabólicamente poco afectadas por el infarto (Fig. 3) (Ankarcrona et al., 1995). La excitotoxicidad está mediada por el influjo excesivo de calcio a través de los receptores ionotrópicos de glutamato (Sattler et al., 1998), mismo que es agravado por la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) y la proteólisis del intercambiador NCX por medio de calpainas (Bano y Nicotera, 2007; Stanika et al., 2012).

La despolarización sostenida de las neuronas y la deficiencia local de ATP tienen un alto impacto en el metabolismo de glutamato. La disponibilidad del glutamato como neurotransmisor está regulada por la participación de las células gliales en el ciclo glutamina-glutamato, en el cual el glutamato liberado al espacio sináptico por las neuronas se recaptura a través de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) por astrocitos perisinápticos y convertido a glutamina por la glutamina sintetasa o utilizado por éstos en otras vías metabólicas como la producción de ATP o síntesis de proteínas. La glutamina es posteriormente transferida de vuelta a las neuronas y convertida a glutamato a través de la glutaminasa donde sirve nuevamente como neurotransmisor (McKenna, 2007).

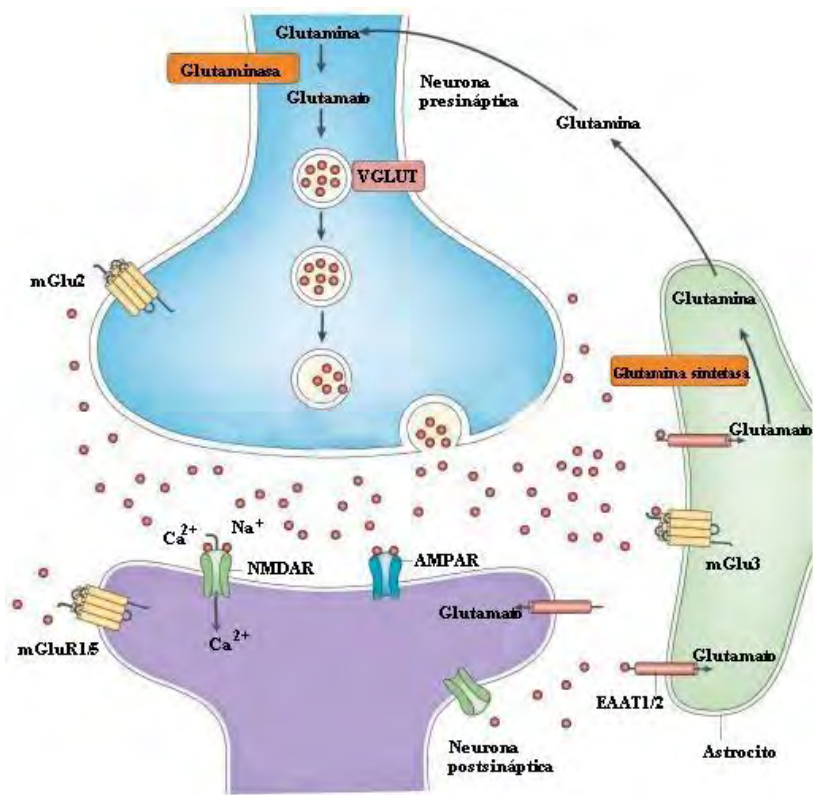


Figura 2. Ciclo glutamina-glutamato. El glutamato neuronal puede ser sintetizado *de novo* a partir de glucosa o a partir de la glutamina suministrada por células gliales por acción de la glutaminasa y empaquetado en vesículas presinápticas. Una vez liberado al espacio sináptico ejerce su efecto sobre receptores ionotrópicos (NMDAR, AMPAR) y metabotrópicos (mGluR1-8) y es recapturado mayoritariamente por los astrocitos a través de los EAAT1/2. El glutamato recapturado puede entrar al ciclo de Krebs o convertirse a glutamina por la glutamina sintetasa y ser transferida de vuelta a las neuronas glutamatérgicas. Modificado de (Popoli et al., 2012).

El transporte de glutamato por los EAAT requiere del cotransporte de 3 iones de Na^+ y un protón y del antiporte de un ión de K^+ , por lo que se trata de un mecanismo dependiente del gradiente eléctrico de la membrana plasmática (Hotzy et al., 2013). Después del infarto isquémico la disminución de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ y el incremento de Na^+ intracelular conducen a la reversión de la actividad de los EAAT y a la acumulación del glutamato en el espacio sináptico (Rossi et al., 2000).

El efecto que ejerce el glutamato en las neuronas está mediado por la activación de receptores ionotrópicos o metabotrópicos en la membrana de las neuronas presinápticas y postsinápticas. Se han descrito tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato permeables a cationes (Ca^{2+} , K^+ y Na^+) luego de la unión del ligando. De acuerdo con las diferencias en su afinidad por agonistas exógenos análogos al glutamato se clasifican en receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) y kainato (Traynelis et al., 2010). El grupo de receptores metabotrópicos está conformado por proteínas transmembranales acopladas a proteínas G que participan en vías de señalización intracelular mediante la generación de segundos mensajeros como inositol trifosfato, diacilglicerol o la inhibición de la adenilato ciclasa (Niswender y Conn, 2010).

El receptor de tipo NMDA es un tetrámero compuesto de dos subunidades GluN1 y dos GluN2A-D y tiene una cinética de activación y desensibilización lenta. La presencia de un ión Mg^{2+} en la entrada del poro en condiciones de reposo bloquea al receptor y lo hace fuertemente dependiente de voltaje. Aunque varía ligeramente de acuerdo a las subunidades que conforman el tetrámero, la permeabilidad a iones de Ca^{2+} del receptor NMDA es la más grande dentro de los receptores ionotrópicos de glutamato (Traynelis et al., 2010). El receptor NMDA es considerado el principal responsable de expandir la lesión fuera del

foco isquémico (Ikemune et al., 1999) sin importar su localización dentro de la sinapsis o el arreglo de sus subunidades cuando existen concentraciones patológicas de glutamato (Sattler et al., 2000; Zhou et al., 2013).

La región carboxilo terminal de las subunidades GluN2 del receptor NMDA interactúa con la proteína de la densidad postsináptica (PSD)-95, misma que es capaz de unirse a la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Sattler et al., 1999). En respuesta a concentraciones tóxicas de glutamato el receptor es capaz de inducir la activación de la nNOS por un mecanismo que involucra a las fosfatasas de proteína 1, 2A y 2B (Rameau et al., 2004; Zhou et al., 2008), lo que coincide con la presencia de niveles elevados de óxido nítrico en las neuronas de la zona peri-infarto (Eliasson et al., 1999). Como será abordado más adelante, el estrés oxidante es uno de los componentes principales en la fase aguda de la cascada isquémica en donde la excitotoxicidad juega un papel importante como agente generador de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La excitotoxicidad a través del receptor NMDA incluye mecanismos de autopropagación que amplifican el efecto excitotóxico. La proteína cinasa asociada a muerte celular 1 (DAPK1) interactúa y fosforila la serina 1303 de la región carboxilo terminal de la subunidad GluN2B de los receptores NMDA después del infarto isquémico, lo que aumenta la permeabilidad del receptor a Ca^{2+} (Tu et al., 2010). Asimismo, la activación de los receptores que contienen a la subunidad GluN2B inducen la formación de nuevos complejos nNOS-PSD-95 y la inhibición de la vía de supervivencia fosfoinositol-3 cinasa (PI3K) al activar a la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (Ning et al., 2004; Tu et al., 2010; Zhou et al., 2010).

Por su parte los receptores AMPA son tetrámeros de las subunidades GluR1-GluR4 generalmente organizados como heterotetrámeros formados por dos homodímeros de

diferentes subunidades (Greger et al., 2007). Su cinética de activación y desensibilización al glutamato es muy rápida aunque su permeabilidad a calcio es variable. La edición del RNA mensajero de la subunidad GluR2 realiza el cambio de una glutamina por arginina en su segundo dominio intramembranal, lo que hace que el receptor sea impermeable a calcio cuando la subunidad GluR2 editada está presente (Egebjerg et al., 1994). A pesar de su poca participación durante del desarrollo de la lesión, la activación de los receptores AMPA y kainato parece mediar la muerte excitotóxica de oligodendrocitos (Tekkok y Goldberg, 2001) y se ha reportado una disminución en los niveles del RNA mensajero de la subunidad GluR2 y la presencia de receptores AMPA permeables a calcio en neuronas después del infarto isquémico (Gorter et al., 1997).

Independientemente del tipo de receptor activado, la característica principal de la lesión excitotóxica es la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ocasionada por la disrupción de la homeostasis de calcio en la mitocondria (Stanika et al., 2009). La acumulación de calcio en la matriz mitocondrial es principalmente por los canales de aniones dependientes de voltaje y el uniportador de calcio mitocondrial y llevan a la activación de la enzima poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), la depleción de NADH y finalmente la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial con la subsecuente activación del programa apoptótico (Abramov y Duchon, 2008; Schafer et al., 2014). Durante el incremento del Ca^{2+} intramitocondrial ocurre la desfosforilación de proteínas componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que conducen a la producción aberrante de ROS capaces de continuar el deterioro de la lesión isquémica (Bender y Kadenbach, 2000; Huttemann et al., 2012).

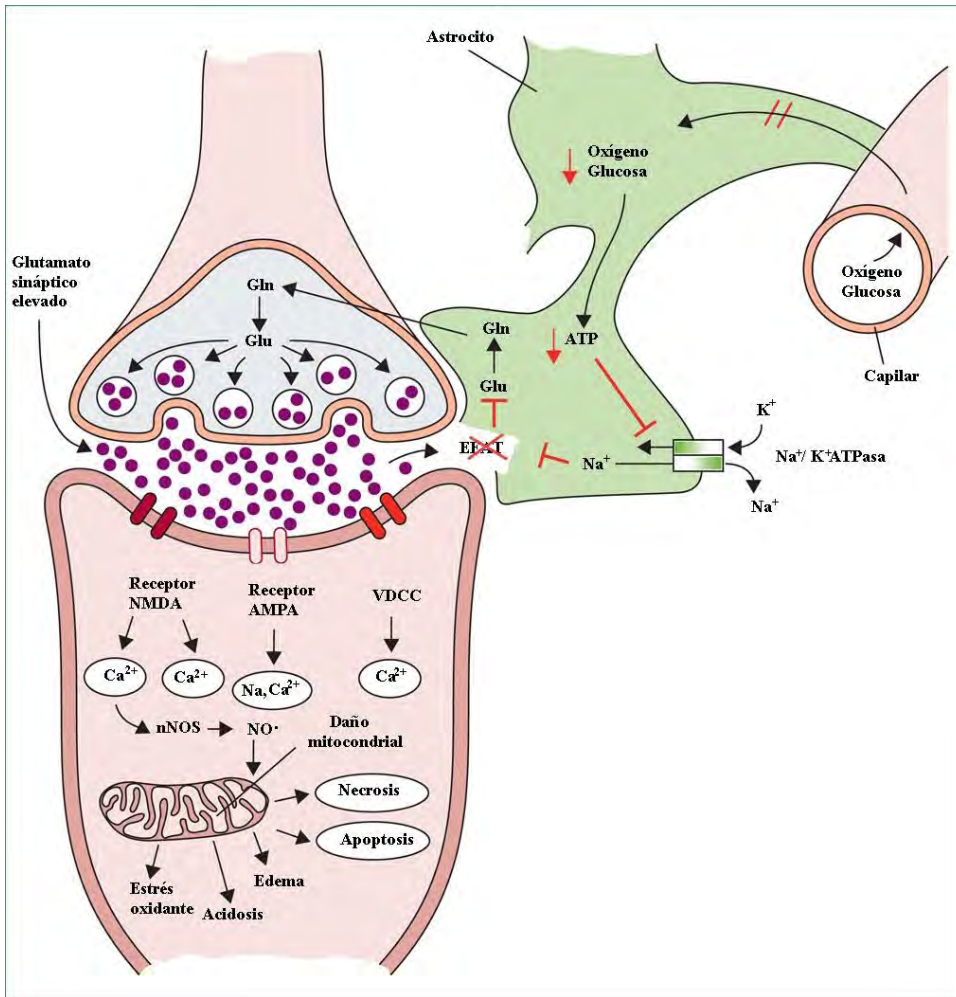


Figura 3. Desregulación del metabolismo del glutamato en isquemia y excitotoxicidad. El fallo energético ocasionado por el infarto isquémico altera el gradiente eléctrico de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ en neuronas y astrocitos además de impedir la recaptura del neurotransmisor glutamato por los EAAT por lo que se acumula en el espacio sináptico y activa a los receptores NMDA y AMPA. Esto genera un influjo excesivo de Ca²⁺ en las neuronas que activa la nNOS y ocasiona daño mitocondrial, estrés oxidante y ulteriormente la muerte celular. Modificado de (Johnston et al., 2011).

Estrés oxidante

Las ROS son moléculas de alta reactividad subproducto del metabolismo oxidante o generadas como mensajeros que incluyen a los radicales libres como el superóxido (O₂⁻) y a las especies derivadas de éste como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La fuente de superóxido más importante es la cadena mitocondrial de transporte de electrones aunque

diversas enzimas contribuyen a la formación de ROS, entre ellas las ciclooxigenasas, lipooxigenasas, NADPH oxidasas (NOX1-5) y xantina oxidasa (Murphy, 2009). Para prevenir el daño ocasionado por las ROS, las células cuentan con diferentes enzimas capaces de regular los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno. Las isoformas 1 y 2 de la enzima superóxido dismutasa catalizan la dismutación del O_2^- en oxígeno molecular y H_2O_2 en el citoplasma y mitocondria respectivamente, mientras que diferentes mecanismos antioxidantes, entre ellos las catalasas y los sistemas dependientes de glutatión, se encargan de la reducción de H_2O_2 a agua (Fernandez-Fernandez et al., 2012). El estrés oxidante es considerado un mecanismo relevante en la patogénesis del infarto isquémico dado que diversas alteraciones contribuyen a la generación excesiva de ROS que sobrepasan la capacidad antioxidante celular. Las fuentes de ROS en el infarto isquémico son variadas y el papel que juegan implica la potenciación de otros mecanismos neurodegenerativos así como un papel activo en la peroxidación de lípidos, proteínas y daño al DNA.

Aunque hay evidencia de un ambiente oxidante en etapas muy tempranas del infarto, el restablecimiento del flujo sanguíneo está acompañado por el deterioro del tejido debido a la generación de ROS (Dominguez et al., 2010; Jung et al., 2010), lo que da lugar al inicio de la expresión de citocinas proinflamatorias y proteínas quimioatrayentes de monocitos (Nishi et al., 2005).

Por otra parte el estrés oxidante forma parte del desarrollo de la lesión excitotóxica (Fig. 3). La actividad de las enzimas NOX que catalizan la conversión de superóxido a partir de oxígeno molecular y NADPH está incrementada después de la sobreactivación del receptor NMDA en la zona de penumbra y constituyen una fuente de superóxido mayor que la actividad mitocondrial aberrante ocasionada por el exceso de Ca^{2+} (Brennan et al., 2009; Miller et al., 2006). Además la actividad de NOX2 promueve la liberación de glutamato al

radical peroxilo. El radical peroxilo a su vez es una especie altamente oxidante que interactúa con otros ácidos grasos y origina un hidroperóxido y un nuevo radical lipídico capaz de replicar el ciclo (Ayala et al., 2014).

Uno de los productos finales de la lipoperoxidación es el 4-hidroxinonenal (HNE), un aldehído que participa en vías de señalización así como en procesos neurodegenerativos dada su alta reactividad hacia los aminoácidos cisteína, histidina y lisina libres o como componentes proteicos (Schaub, 2003; Zarkovic, 2003) para formar aductos detectables dentro de las primeras horas después de la reperfusión (Yoshino et al., 1997). El mecanismo neurodegenerativo mediado por HNE incluye la facilitación de la apertura de VDCCs y un aumento transitorio en la permeabilidad de los receptores NMDA (Lu et al., 2002; Lu et al., 2001). Además de la formación de aductos de tubulina que inhiben la polimerización de los microtúbulos y alteran la estabilidad del citoesqueleto (Kokubo et al., 2008; Neely et al., 2005).

Apoptosis

El daño ocasionado a la zona de penumbra es considerado potencialmente reversible. Sin embargo, la progresión de la cascada isquémica tiene como resultado la muerte celular en una forma predominantemente apoptótica en las poblaciones de neuronas inicialmente poco afectadas por el infarto capaces de activar un tipo de muerte programada y ordenada (Martin et al., 1998).

De manera general, un grupo de proteasas de cisteína denominado caspasas lleva a cabo el programa apoptótico, mismas que son sintetizadas como precursores inactivos sujetos a una activación proteolítica. Las caspasas iniciadoras son activadas en respuesta a una señal pro-apoptótica y tienen como sustrato a las caspasas efectoras responsables de la muerte celular. De acuerdo con la señal que desencadena el proceso apoptótico, la apoptosis puede ocurrir

a través de una vía intrínseca originada por la pérdida de la integridad mitocondrial o una vía extrínseca regulada por la activación de receptores en la membrana plasmática (Elmore, 2007).

La vía intrínseca inicia con la pérdida del potencial transmembranal mitocondrial y la formación de un poro de transición que permite la liberación del citocromo c y otros factores pro-apoptóticos. El citocromo c se une a la procaspasa 9 y al factor activador de las proteasas apoptogénicas en un complejo llamado apoptosoma, lo que tiene como resultado la activación proteolítica la procaspasa 9 (Bratton et al., 2001). Por su parte la vía extrínseca parte de la activación de la procaspasa 8 a través del dominio intracelular de los receptores de muerte DR4/5, el receptor del factor de necrosis tumoral o el receptor Fas (Elmore, 2007). Ambas vías convergen en la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7 y la subsiguiente degradación proteolítica de componentes del citoesqueleto como la gelsolina, fodrina y actina (Kothakota et al., 1997; Sakahira et al., 1998; Slee et al., 2001), la activación de PARP y la DNAsa activada por caspasas (Boulares et al., 1999; Enari et al., 1998).

Durante las primeras horas de la cascada isquémica la sobreactivación de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica del linfoma de células B-2 (Bcl-2) encargada de regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Fan et al., 2015), mientras que la acumulación intracelular de Ca^{2+} inhibe a los complejos I y IV de la cadena de transportes de electrones y origina la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria en la etapa temprana de la reperfusión, lo que facilita la liberación del citocromo c (Racay et al., 2009). Por su parte, el estrés oxidante se ha vinculado con la activación de la caspasa 3 a través de la producción de NO después del infarto y a la activación del programa apoptótico mediante la degradación de la proteína

cinasa B1 (Akt) (Sun et al., 2009; Wakatsuki et al., 2015). Como resultado, la etapa subaguda de la cascada isquémica coincide con el pico de marcadores apoptóticos como la expresión elevada de caspasa 3 y la formación del apoptosoma (Cao et al., 2004; Rami et al., 2003), así como la detección del receptor Fas y su ligando en las neuronas contenidas en la zona de penumbra y la secreción de agentes inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa por células de la microglia (Guadagno et al., 2013; Sairanen et al., 2006).

El factor de crecimiento vascular endotelial

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF o VEGF-A) es miembro de una familia de factores de crecimiento conocidos por su efecto angiogénico que incluyen al factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D (Ferrara et al., 2003). VEGF es el miembro más estudiado y se ha demostrado que su actividad no se limita a la angiogénesis y sobrevivencia de las células endoteliales sino que realiza diversas funciones biológicas entre las que destaca un papel relevante en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas (Storkebaum y Carmeliet, 2004).

En el humano el gen de VEGF está organizado en 8 exones separados por 7 intrones y el transcrito primario es sujeto a splicing alternativo, lo que da lugar a 6 isoformas de 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos de extensión respectivamente que difieren en su localización extracelular y afinidad por sus receptores (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991). Todas las isoformas cuentan con los exones 1-5, mientras que los exones 6 y 7 contienen dominios de unión a heparina de manera que las isoformas que los presentan están en su mayoría secuestradas en la matriz extracelular y pueden ser liberadas a través de un corte proteolítico en el exón 5, que contiene secuencias reconocidas por plasmina y metaloproteinasas de matriz (Park et al., 1993). Las variantes VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ se unen a

la heparina con gran afinidad mientras que la isoforma VEGF₁₂₁ es muy soluble, VEGF₁₆₅ es considerada una isoforma intermedia que puede encontrarse de forma soluble o asociada a la matriz extracelular (Ferrara et al., 2003).

Dentro de la región promotora del gen de VEGF se localiza un elemento de respuesta a hipoxia que permite la unión del factor inducible por hipoxia (HIF-1) (Forsythe et al., 1996), un factor de transcripción heterodimérico formado por la subunidad constitutivamente expresada HIF-1 β y la subunidad HIF-1 α que en condiciones de normoxia se degrada en un proceso mediado por la hidroxilación dependiente de oxígeno de los residuos de prolina 402 y 564 por enzimas prolil hidroxilasas, lo que envía a la proteína a la vía de degradación proteosomal (Weidemann y Johnson, 2008). Cuando la tensión de oxígeno cae la actividad de las prolil hidroxilasas disminuye y HIF-1 α se transloca al núcleo y se dimeriza con HIF-1 β (Bruick y McKnight, 2001).

El VEGF ejerce su actividad biológica a través de los receptores de tipo tirosina cinasa VEGFR1 y VEGFR2. Se trata de receptores estructuralmente similares con 7 dominios parecidos a inmunoglobulina en la porción extracelular, un motivo transmembranal y un dominio de cinasa de tirosina con un inserto rico en tirosinas fosforilables en la región intracelular (Rahimi, 2006). Otros miembros de la familia de VEGF como PlGF y VEGF-B también son ligandos de VEGFR1, VEGF-C y VEGF-D son ligandos de VEGFR2 (Ferrara et al., 2003). Adicionalmente, la isoforma VEGF₁₆₅ puede unirse a un grupo de correceptores conocido como neuropilinas cuya función es presentar el ligando a los receptores VEGFR2 y favorecer su activación (Pan et al., 2007).

La activación de VEGFR2 inicia con la dimerización del receptor desencadenada por la unión de su ligando seguida de varios eventos de transfosforilación en residuos de tirosina y serina (Fig. 5) (McTigue et al., 1999; Singh et al., 2005). El VEGFR2 es reconocido como

el principal responsable de los efectos antiapoptóticos y mitogénicos del VEGF a través de la activación de las vías de señalización intracelular mediadas por PI3K y la fosfolipasa C γ (PLC) (Abid et al., 2004; Xiong et al., 2009). Por su parte el VEGFR1 en células endoteliales regula procesos como la liberación de factores de crecimiento, la activación de metaloproteinasas y la expresión de algunos genes antiapopóticos (Adini et al., 2002). Sin embargo, la tasa de fosforilación de VEGFR1 y su capacidad para fosforilar otros sustratos es muy baja (Waltenberger et al., 1994) y se ha descrito que actúa como un modulador del efecto de VEGF que puede formar heterodímeros con VEGFR2 y potenciar la señalización a través de este receptor o secuestrar las formas solubles de VEGF y prevenir la activación de VEGFR2 (Autiero et al., 2003; Kearney et al., 2004).

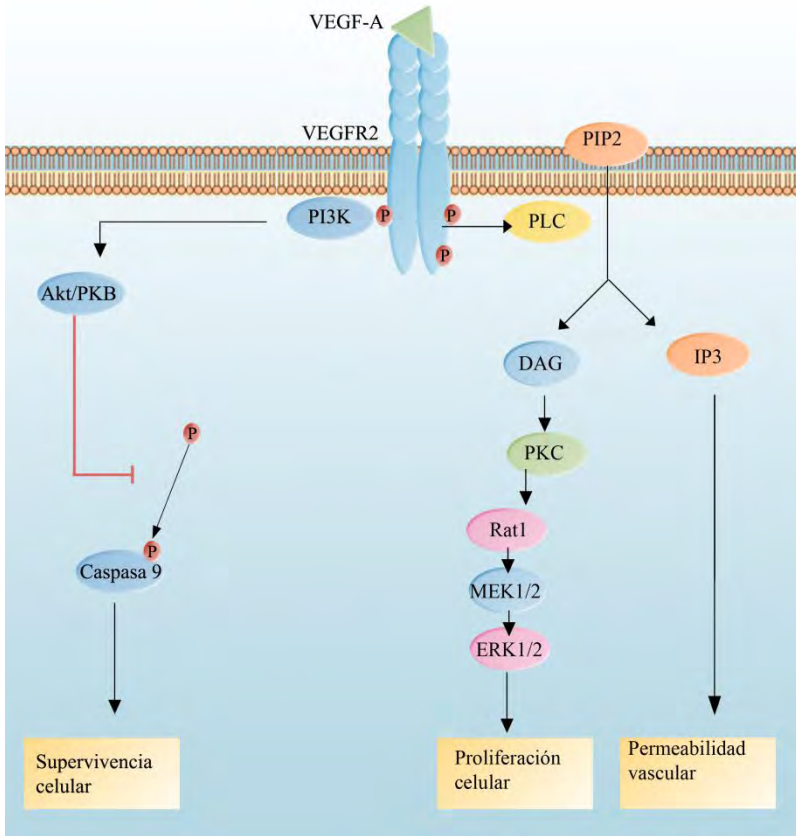


Figura 5. Señalización a través de VEGFR2. El ligando VEGF-A induce la dimerización y transfosforilación del receptor VEGFR2 con la subsecuente activación de diferentes vías de señalización. La activación de la vía de PI3K/Akt resulta en la inhibición de la apoptosis mientras que la activación de la PLC forma, a partir del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), diacilglicerol (DAG) capaz de promover la proliferación celular a través de las cinasas activadas por mitógeno MEK/ERK y la formación de inositol trifosfato (IP3). Modificado de (Taimeh, et al. 2013).

Planteamiento del problema

La progresión de la cascada isquémica es un evento heterogéneo y complejo que agrava el daño generado por el infarto isquémico y persiste incluso después de la restauración de la perfusión sanguínea. A pesar de la existencia de tratamientos clínicos que buscan la recanalización de la arteria obstruida, éstos cuentan con una corta ventana terapéutica y varias contraindicaciones que limitan su aplicación y disminuyen su efectividad (Sheth et al., 2015). Por consecuencia, resulta de gran importancia la búsqueda de nuevas estrategias que permitan reducir el impacto del evento isquémico sobre el parénquima cerebral, tal es el caso de la utilización de factores tróficos como agentes neuroprotectores (Uzun et al., 2010).

El infarto isquémico induce un aumento en los niveles de RNA mensajero de VEGF y la expresión de la proteína en neuronas y astrocitos en modelos *in vivo* así como de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en células endoteliales, neuronas y astrocitos en la etapa aguda de la cascada (Jin et al., 2000b; Margaritescu et al., 2011).

Se ha demostrado el efecto neuroprotector del VEGF en modelos *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa y en modelos *in vivo* en donde reduce el tamaño de la lesión, favorece la neurogénesis y la formación de nuevas neuronas a partir de astrocitos estriatales (Jin et al., 2000a; Shen et al., 2016). Además, se ha reportado la participación de los receptores VEGFR2 y VEGFR1 en la neuroprotección mediada por otros miembros de la familia de VEGF (Du et al., 2010). Sin embargo, la administración de VEGF produce la apertura de la barrera hematoencefálica y angiogénesis aberrante (Jiang et al., 2014; Wang et al., 2005), procesos que comprometen el estado del tejido y pueden contribuir a agravar la lesión en mayor medida que su efecto benéfico. Este efecto dual ha hecho difícil esclarecer el mecanismo y la magnitud de la neuroprotección mediada por dicho factor trófico.

El propósito de este trabajo es evaluar el potencial neuroprotector del VEGF ante los mecanismos implicados en la fase aguda de la cascada isquémica, determinar su efecto sobre la supervivencia neuronal e iniciar la identificación de algunos de los componentes de las vías de señalización implicadas.

Hipótesis

El VEGF tiene un efecto neuroprotector contra los estímulos neurodegenerativos de excitotoxicidad, estrés oxidante y la inducción de apoptosis a través de la activación del receptor VEGFR2.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de VEGF recombinante sobre la muerte generada por excitotoxicidad, estrés oxidante y apoptosis en cultivos neuronales de rata e identificar al receptor responsable de dicho efecto.

Objetivos particulares

- Establecer cultivos de neuronas corticales de rata.
- Determinar la presencia de los receptores de VEGFR1 y 2 en neuronas corticales por inmunocitoquímica.
- Evaluar el efecto neuroprotector de VEGF en un modelo de privación de factores tróficos.
- Estandarizar los modelos de muerte neuronal de excitotoxicidad por NMDA, estrés oxidante mediado por HNE e inducción de apoptosis a través de estaurosporina (STS) *in vitro*.
- Evaluar el efecto de los tratamientos en la viabilidad celular a través de técnicas de microscopía confocal y la medición de la actividad mitocondrial celular.
- Evaluar el efecto de los tratamientos en la densidad de espinas dendríticas por microscopía de epifluorescencia.

Diseño experimental

Cultivo primario de neuronas corticales

Los cultivos primarios de neuronas corticales se realizaron a partir del cerebro de embriones de rata Wistar (día embrionario 17) en los cuales se realizó la disección de las cortezas y se retiró el hipocampo. Las células fueron sembradas a una densidad final de 2.5×10^5 células/ 1.9 cm^2 en cajas de cultivo multipozo o 2.5×10^5 células/ 3.8 cm^2 en cubreobjetos de vidrio previamente cubiertos con polietilenimina. Las células destinadas al conteo de espinas dendríticas se sembraron en cubreobjetos de vidrio a una densidad final de 5×10^3 células/ 3.8 cm^2 .

Se utilizó el medio Neurobasal (GIBCO) suplementado con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES, 4.7 mM), L-glutamina (1.2 mM), suero fetal bovino 5% (v/v) y el complemento B27 (GIBCO) para cultivar las neuronas, 3 h después del cultivo se realizó un cambio de medio por uno sin suero en el que las neuronas permanecieron hasta el día *in vitro* (DIV) 12. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%.

Tratamientos

Todos los tratamientos fueron aplicados en el DIV 11 del cultivo con una duración de 24 h después de las cuales se realizaron las pruebas de viabilidad celular. Salvo cuando se especifica, la exposición se realizó de manera conjunta con la administración de VEGF recombinante de rata disuelto en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8mM, pH 7.4) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1%. Todas las condiciones experimentales se montaron por triplicado en la misma caja de cultivo con pozos múltiples.

Modelo de excitotoxicidad

Se trataron las neuronas con NMDA, el agonista selectivo de los receptores de glutamato para inducir su sobreactivación y generar excitotoxicidad. Se emplearon las concentraciones experimentales de 1, 10, 100 y 1000 μM en cada pozo al añadir al medio una solución de NMDA disuelto en PBS. Se añadió además VEGF recombinante de rata disuelto en PBS con BSA al 0.1% a una concentración final de 10 ng/mL en los pozos que se indica. Las células no tratadas recibieron un volumen equivalente de PBS.

Modelo de estrés oxidante

Los cultivos fueron expuestos a estrés oxidante mediante la incubación durante 24 h con HNE. Se implementaron condiciones experimentales de HNE 10, 25 y 50 μM a partir de una solución de HNE en etanol. Las células no tratadas con HNE recibieron un volumen equivalente de etanol. Se añadió VEGF recombinante de rata a la concentración de 10 ng/mL en los pozos indicados.

Modelo de muerte apoptótica

Se empleó la toxina STS como agente inductor de apoptosis en cultivos primarios neuronales. Se generaron las condiciones experimentales de STS 10, 50 y 100 nM a partir de una solución de STS en dimetilsulfóxido. Los pozos no tratados con STS recibieron un volumen equivalente del vehículo. En los experimentos así indicados también se añadió VEGF recombinante de rata 10 ng/mL.

Privación de factores tróficos

Se realizó un cambio de medio en el DIV 11 por Neurobasal sin B27 o Neurobasal con VEGF (10 ng/mL). A los controles únicamente se les cambió el medio.

Evaluación de la viabilidad celular por microscopía confocal

Durante el DIV 12 y 24 h después del inicio del tratamiento se reemplazó el medio de cultivo de células sembradas en cubreobjetos de vidrio por una solución de calceína-AM 1 μ M (espectro de excitación/emisión 495/515 nm), homodímero de etidio (EthD-1) 1 μ M (excitación/emisión 528/617 nm) y DAPI (10 ng/mL) en solución de Locke (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl₂ 2.3 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, HEPES 5 mM, glucosa 1 mM, pH 7.4). Las células se incubaron durante 1 h antes de ser examinadas en el microscopio confocal vertical LEICA TCS SP5 con un objetivo de inmersión en agua 40X. Se emplearon los láseres UV-405 nm, Argón- 488 nm y He/Ne-543 nm para la visualización de los fluoróforos DAPI, calceína y homodímero de etidio respectivamente. Se realizaron reconstrucciones en Z de 30 cortes ópticos de 0.5 μ m en 5 campos representativos de cada condición a través del software LEICA Application Suite AF lite.

Evaluación de la actividad metabólica

La actividad metabólica se evaluó mediante la conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en cristales de formazán insolubles al reducirse por la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Se agregó MTT a las células (0.1 mg/mL) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Se retiró el medio y los cristales formados se disolvieron en isopropanol con HCl (4 mM). Se centrifugó el contenido de cada pozo para eliminar restos celulares y se cuantificó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se presentan como el porcentaje de la absorbancia obtenida en los tratamientos con respecto a la obtenida en los controles.

Conteo de espinas dendríticas

La evaluación de la densidad de espinas dendríticas se realizó con los componentes del kit Neurite Outgrowth Staining (Life Technologies, Carlsbad, California), el cual contiene calceína-AM como indicador de viabilidad celular y un colorante que tiñe la membrana plasmática (espectro de excitación/emisión 565/555 nm) además de un agente supresor de autofluorescencia. Los colorantes y el agente supresor fueron provistos como soluciones 1000X y 100X respectivamente. Las células sembradas en cubreobjetos de vidrio se fijaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución 1X de los colorantes y paraformaldehído al 3.7%. Se retiró el paraformaldehído y se agregó el supresor de autofluorescencia durante 15 min para después transferir los cubreobjetos a portaobjetos con medio de montaje.

Cada preparación se observó en el microscopio de epifluorescencia LEICA DM600. Se tomaron fotografías del soma y todas las prolongaciones de diferentes neuronas para cada condición experimental. Posteriormente se realizó la cuantificación de la longitud de todas las neuritas así como de las espinas dendríticas con el software ImageJ (NIH, EEUU). Los resultados se expresan como la longitud promedio en μm de las neuritas y la densidad de espinas dendríticas como una relación del número de éstas por cada 10 μm de longitud.

Inmunocitoquímica

Las neuronas corticales de rata sembradas en cubreobjetos fueron fijadas con metanol al 100% durante 30 minutos a 4 °C en el DIV 7. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS e incubaron por 1 h en una solución de bloqueo (PBS, BSA 5%, Triton X100 0.3%). Se realizó el marcaje de los receptores 1 y 2 de VEGF utilizando una dilución 1:100 de los anticuerpos primarios anti-VEGFR1 (LifeSpan Biosciences, Seattle, Washington; LS-

C160522) o anti-VEGFR2 (LifeSpan Biosciences; LS-C318629) en solución de bloqueo. Del mismo modo, para la detección de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) se empleó una dilución 1:100 del anticuerpo anti-MAP2 (Sigma, St. Louis, Missouri; M4403) en solución de bloqueo. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS las células fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 546 y anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A11035-LT y A21121-LT) en una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Posteriormente se incubó con DAPI (300 nM) por 5 minutos y los cubreobjetos se montaron con medio de montaje (DAKO).

Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal vertical LEICA TCS SP5 con un objetivo de inmersión en aceite 40X. Se emplearon los láseres UV-405 nm, Argón- 488 nm, He/Ne-543 nm y se realizaron reconstrucciones en Z de 30 cortes ópticos de 0.5 μm a través del software LEICA Application Suite AF lite.

Resultados

Expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en neuronas corticales.

Para conocer si las neuronas corticales expresan alguno de los receptores necesarios para la señalización de VEGF se realizó una inmunocitoquímica para identificar la presencia de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en cultivos de neuronas corticales en el DIV 7. La figura 6 muestra que ambos receptores se localizan principalmente en el soma de las neuronas aunque también se detectan en las neuritas. Igualmente el receptor VEGFR2 se encuentra en algunas células gliales presentes en el cultivo primario. La presencia de ambos receptores sugiere que VEGF puede tener un efecto directo sobre las neuronas corticales.

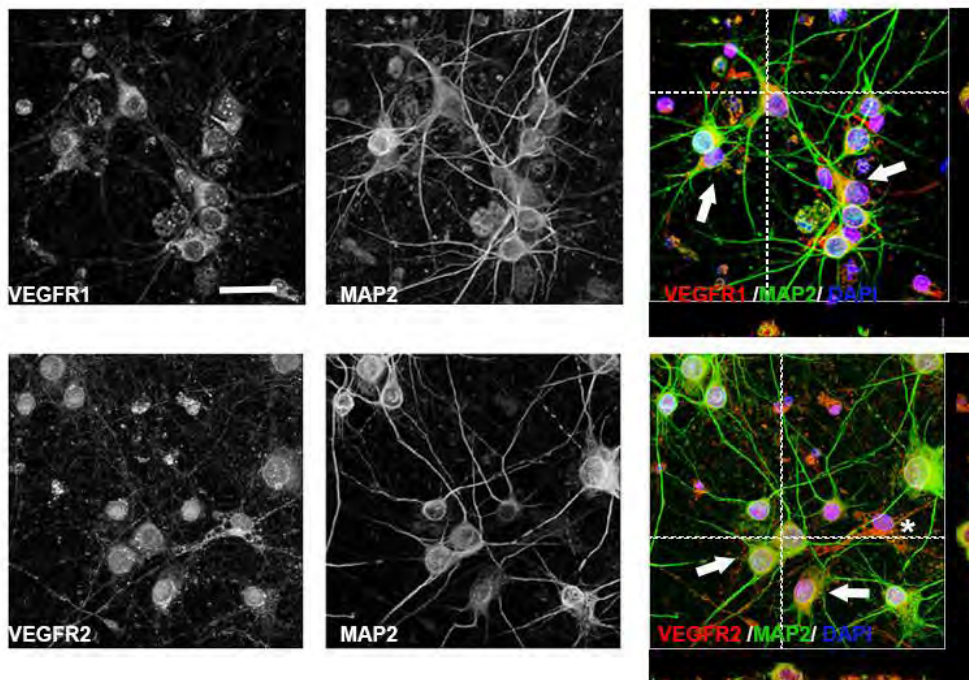


Figura 6. Localización de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en neuronas corticales, Fotografías representativas de neuronas corticales cultivadas durante 7 días. Se utilizó a la proteína MAP2 como marcador específico de neuronas, vista en el canal verde. Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 se aprecian en el canal rojo. Se presenta la proyección máxima de 30 cortes ópticos de 0.5 μm , barra de calibración= 25 μm , n=3. Se encontró la presencia de los receptores en el soma de todas las neuronas (flechas), además del receptor VEGFR2 en una célula glial no marcada con MAP2 (*).

VEGF evita parcialmente la muerte provocada por la privación de factores tróficos en cultivos de neuronas corticales.

Con el objetivo de establecer si el VEGF es capaz de revertir efectos neurodegenerativos causados por la privación de factores tróficos, en el DIV 11 se cambió el medio de las células por Neurobasal fresco sin suplemento B27, la viabilidad se determinó por el ensayo de reducción de MTT y se observó la muerte del 46% de las células en cultivo con respecto a aquellas que recibieron medio suplementado (Fig. 7). En los cultivos suplementados con 10 ng/mL de VEGF se registró una menor pérdida de la viabilidad celular del 31%. Lo que sugiere que el VEGF rescata parcialmente a las neuronas de la muerte neuronal inducida bajo estas condiciones.

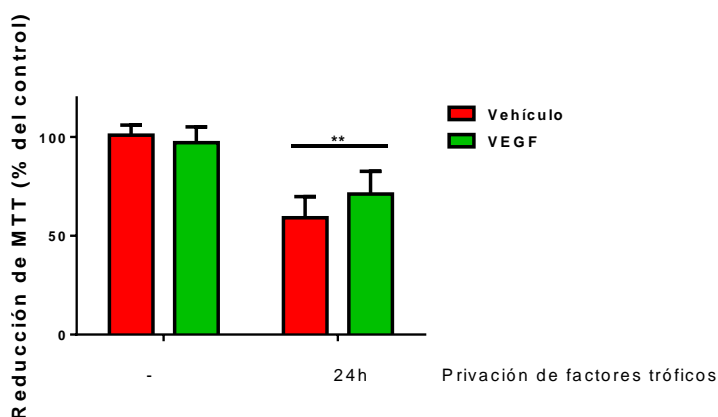


Figura 7. La privación de factores tróficos produce la muerte de neuronas en cultivo, misma que puede parcialmente ser rescatada por VEGF. Las células mantenidas durante 24 h en un medio sin suplemento (◦) mostraron una disminuida actividad metabólica comparada con el control. La administración de 10 ng/mL de VEGF rescata al 15% de las células dañadas durante este estímulo (▪). Datos presentados como promedio \pm desviación estándar, n = 8. **P < 0.01 comparado con vehículo.

VEGF reduce la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad

Neuronas corticales en el DIV 11 fueron expuestas por 24 h a NMDA con el fin de generar la muerte excitotóxica en las neuronas y evaluar el efecto neuroprotector de la administración de 10 ng/mL de VEGF. En los ensayos de microscopía confocal la presencia de calceína al interior de las células y la ausencia del colorante EthD-1 se utilizó como indicador de células metabólicamente activas mientras que la colocación de DAPI y el colorante impermeable EthD-1 indica la alteración de la membrana plasmática en células muertas. La exposición por 24 h a NMDA incrementó la proporción de neuronas muertas en el cultivo respecto a la muerte basal del control, detectables en todas las condiciones experimentales probadas (Fig. 8a). Por su parte, no se apreció una reducción significativa en la cuantificación de MTT reducido respecto al control en células expuestas a NMDA 1 μ M. A diferencia de las otras concentraciones en donde se apreció una disminución del 23%, 43% y 69% en presencia de NMDA 10 μ M, 100 μ M y 1000 μ M respectivamente, respecto al control. Estos resultados en conjunto comprueban la existencia de un estímulo excitotóxico inducido por la incubación con NMDA durante 24 h (Fig. 8b).

La administración de VEGF tuvo un efecto benéfico significativo al reducir en un 17% y 19% la muerte inducida por las concentraciones más altas de NMDA en los cultivos neuronales detectada en el ensayo de MTT. En el caso de NMDA 10 μ M se presentó una mayor supervivencia al administrar VEGF que no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Estos resultados demuestran que VEGF es capaz de evitar la muerte excitotóxica.

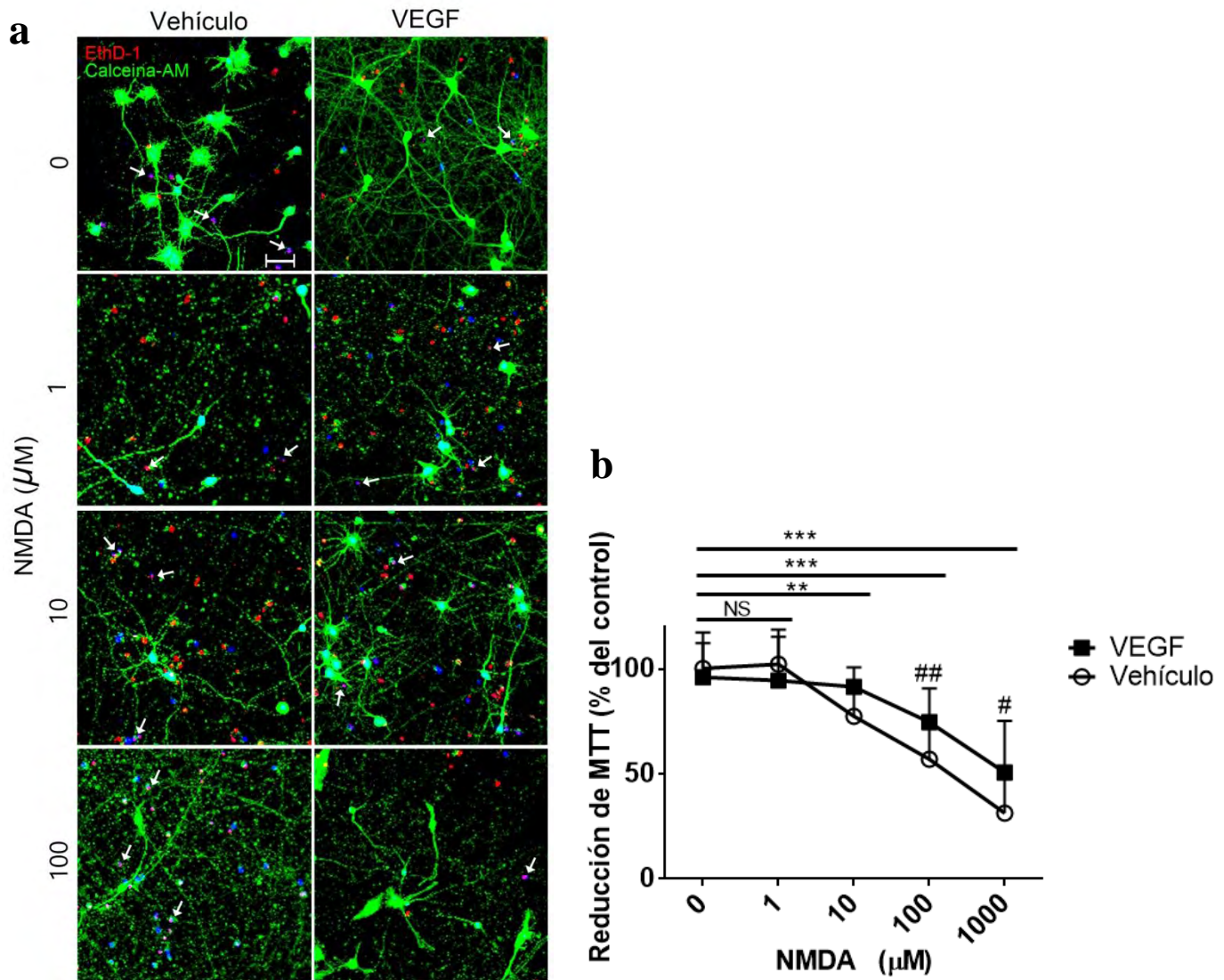


Figura 8. VEGF evita la muerte neuronal ocasionada por un estímulo excitotóxico.

Neuronas corticales en el DIV 11 fueron expuestas por 24 h a NMDA con la administración de VEGF (10 ng/mL) o vehículo. **a.** Teñidas con calceína, EthD-1 y DAPI y visualizadas por microscopía confocal. Se muestra la proyección máxima de 30 cortes ópticos de 0.5 μ m. Se aprecia un incremento en el número de células muertas (flechas) en los cultivos expuestos a NMDA así como la degeneración de procesos celulares en las neuronas viables (n=3, barra de calibración = 50 μ m) **b.** El NMDA disminuye la viabilidad de las células tratadas (\circ), este efecto se reduce significativamente al administrar VEGF (\blacksquare). Datos presentados como promedio \pm desviación estándar, n= 5.*P<0.05 comparado con el control. #P< 0.05 comparado contra la misma concentración de NMDA sin VEGF. NS= No significativo.

El VEGF no evita la muerte neuronal inducida por HNE.

Se implementó un modelo de estrés oxidante con la exposición a HNE en cultivos neuronales para determinar la capacidad neuroprotectora del VEGF. La evaluación de la viabilidad celular medida por microscopía confocal mostró un aumento en la proporción de células muertas con el tratamiento con HNE. Las células que permanecieron viables al incubarse con HNE 25 μ M y VEGF mostraron procesos celulares mejor definidos que aquellos sin VEGF aunque la proporción de células muertas fue similar en ambas condiciones. La concentración de HNE 50 μ M indujo la muerte de gran parte del cultivo, la cual no pudo ser revertida por la administración de VEGF (Fig. 9a).

La incubación con HNE 10 μ M no provocó un cambio significativo en los ensayos de reducción de MTT comparado con las células sin tratamiento. Por su parte las concentraciones de HNE 25 μ M y 50 μ M provocaron una disminución del 44% y 83% en la actividad metabólica medida. Aunque el tratamiento con VEGF parece reducir la muerte inducida por la concentración de HNE 25 μ M, este efecto no resultó estadísticamente significativo (Fig. 9b).

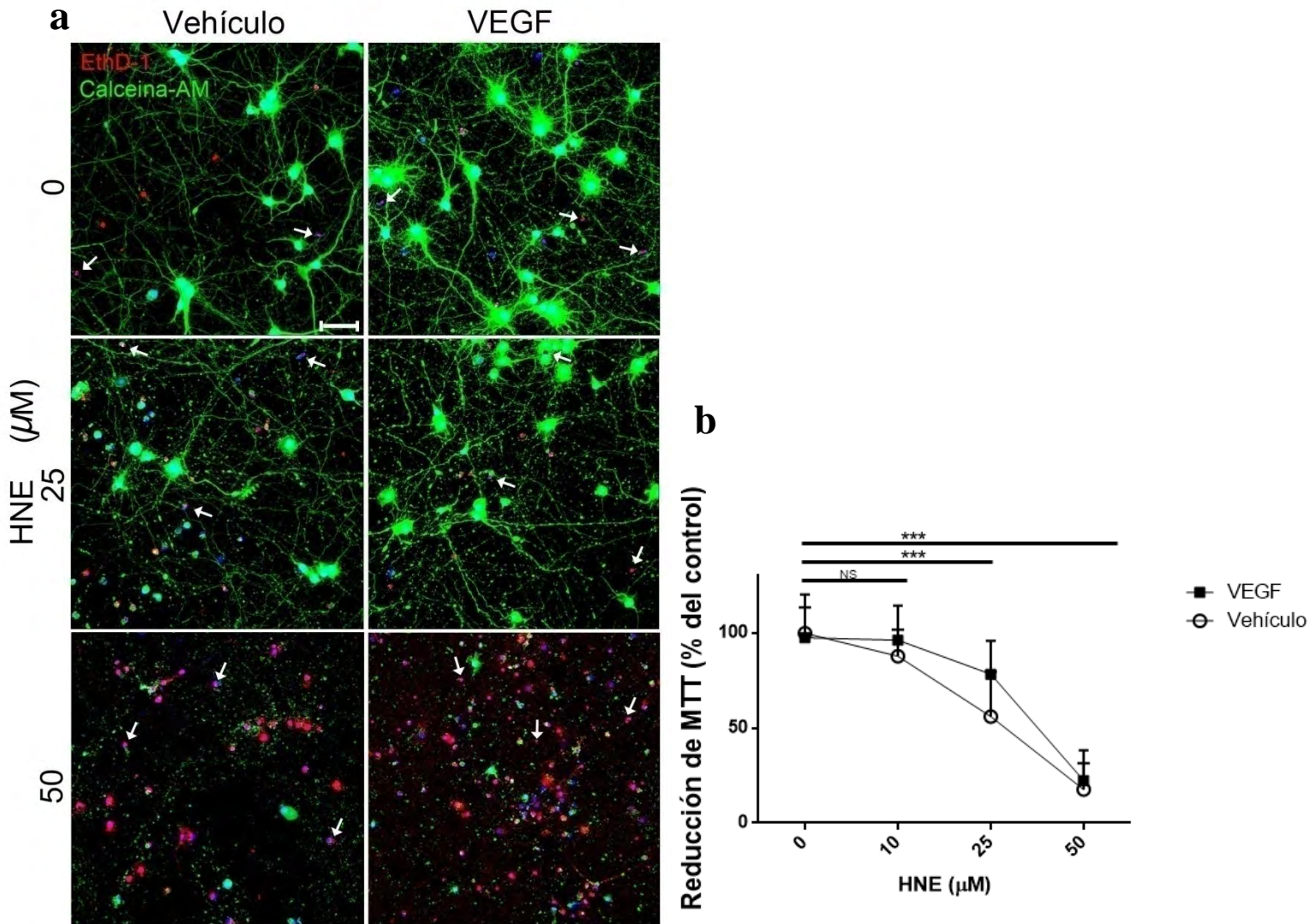


Figura 9. La muerte ocasionada por el estrés oxidante no es rescatada por VEGF. a. La exposición a HNE durante 24 h en neuronas corticales en el DIV 11 ocasionó la pérdida moderada de la integridad celular (flechas) en la condición HNE 25 μM y de forma casi total a 50 μM . Se muestra la proyección máxima de 30 cortes ópticos de 0.5 μm ($n=3$, barra de calibración = 50 μm) **b.** Hay decremento significativo en la capacidad de reducir MTT en células tratadas con HNE (\circ) 25 μM y 50 μM , efecto que no se evita con la administración de VEGF (\blacksquare). Datos presentados como promedio \pm desviación estándar, $n=4$. *** $P<0.001$ comparado con el control. NS= No significativo.

VEGF no evita la muerte neuronal inducida por la incubación con estaurosporina.

Para establecer si la administración de VEGF puede evitar la muerte apoptótica de las neuronas corticales se implementó un modelo de apoptosis inducido por STS. La incubación con STS por 24 h en cultivos primarios de neuronas corticales indujo un marcado decremento en el número de células vivas de acuerdo con los ensayos de microscopía confocal (Fig. 10a).

Las concentraciones de STS 10 nM, 50 nM y 100 nM provocaron un decremento del 21%, 60% y 72% respectivamente en los niveles de MTT reducido respecto al control (Fig. 10b).

La administración de VEGF no evitó este efecto.

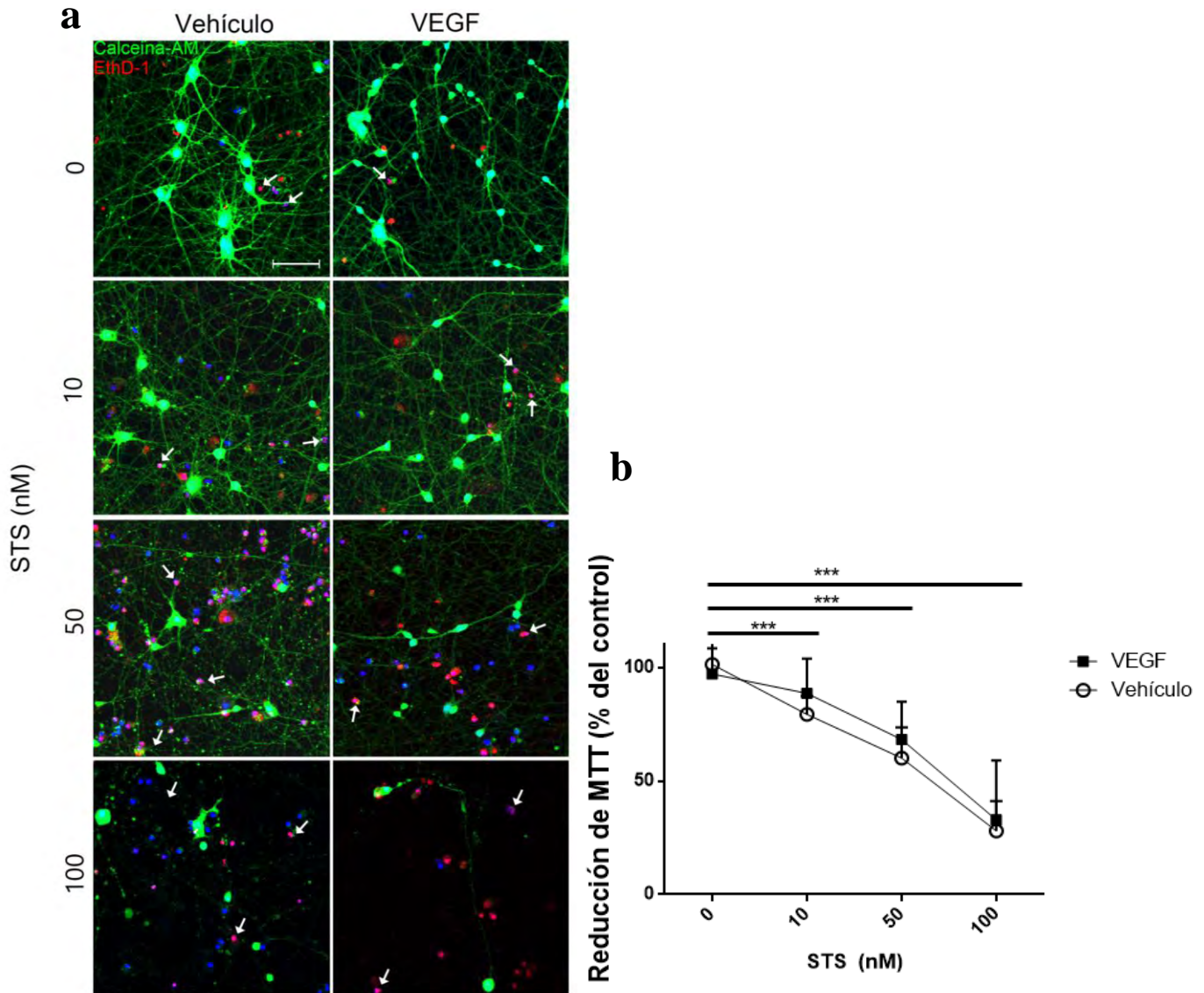


Figura 10. La muerte apoptótica provocada por estaurosporina no es rescatada por VEGF. **a.** Después ser expuestos a STS durante 24 h se observó **a.** un incremento en el número de células muertas (flechas) en todas las condiciones experimentales. Se muestra la proyección máxima de 30 cortes ópticos de $0.5 \mu\text{m}$ ($n=3$, barra de calibración = $50 \mu\text{m}$) **b.** Corroborado por una disminución en los niveles de MTT reducido por los cultivos expuestos a STS (○), efecto que no se evita con la administración de VEGF (■). Datos presentados como promedio \pm desviación estándar, $n=6$.*** $P<0.001$ comparado con el control.

El NMDA y el HNE en condiciones subletales inducen una disminución en la densidad de espinas dendríticas.

Para evaluar si las neuronas sobrevivientes a un estímulo neurotóxico moderado sufrían algún tipo de alteraciones morfológicas que pudieran ser rescatadas por la administración de VEGF, las células se sometieron a un estímulo excitotóxico u oxidante subletal y se evaluó la longitud de las neuritas y la densidad de espinas dendríticas por microscopía de epifluorescencia (Fig. 10a-b). La administración de VEGF no modificó la longitud de las neuritas ni la densidad de espinas dendríticas en las células control.

Del mismo modo, la incubación con concentraciones de NMDA o HNE que no tuvieron impacto significativo en la viabilidad celular tampoco redujeron la longitud de los procesos celulares (Fig. 11a). Sin embargo, se observó una disminución en la densidad de espinas dendríticas cuando las células se incubaron con NMDA, HNE o STS. La administración de VEGF mantuvo la integridad de las espinas dendríticas de las neuronas expuestas a NMDA, no así en el caso del estímulo oxidante (Fig. 11b). De manera similar a lo observado en las evaluaciones de viabilidad, estos resultados apuntan a que el VEGF es capaz de evitar las alteraciones morfológicas ocasionadas por excitotoxicidad pero no evitan el daño debido al estrés oxidante.

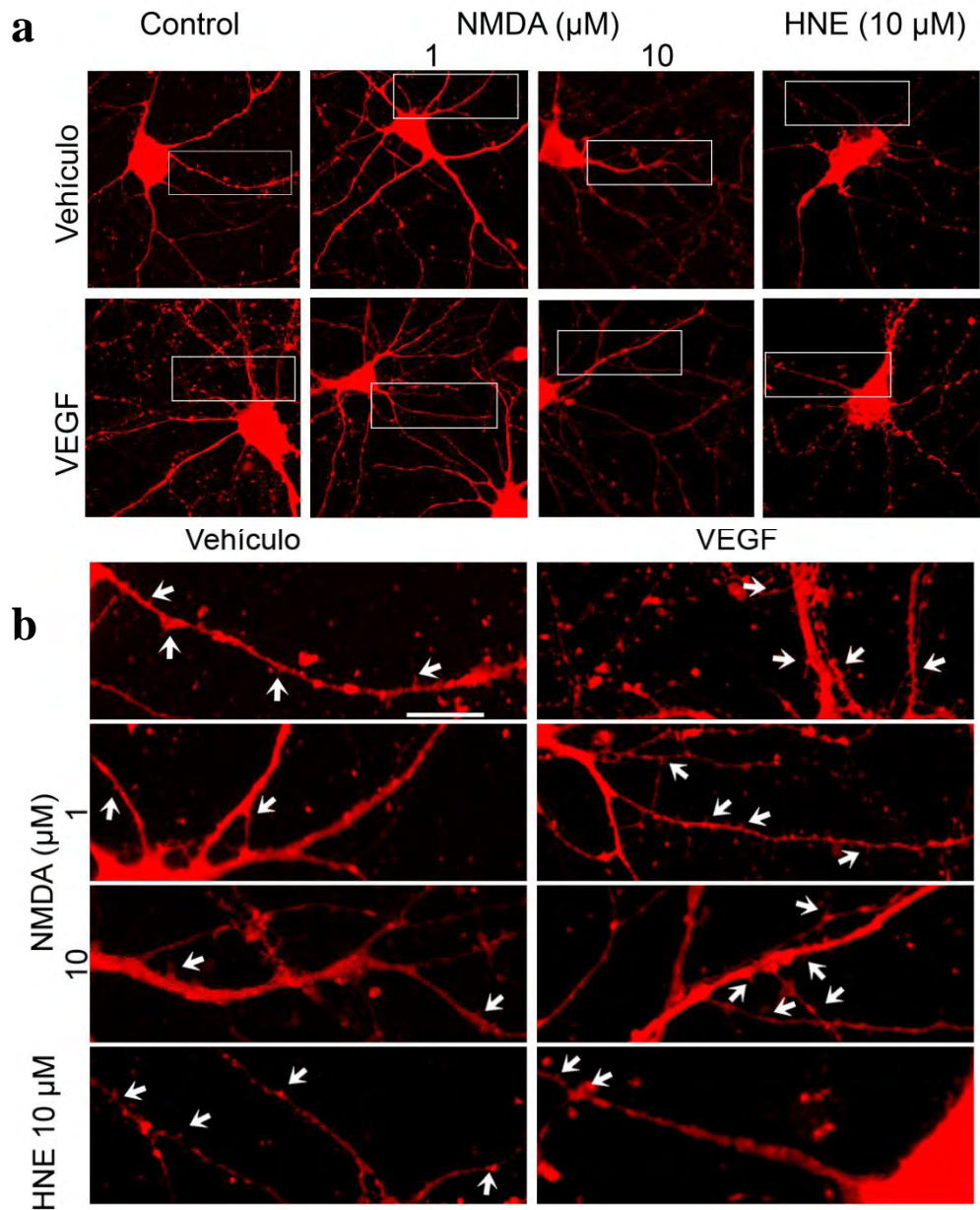


Figura 10. El estímulo subletal de NMDA y HNE induce cambios morfológicos en neuronas corticales. a. Fotografías representativas de neuronas expuestas a NMDA 1 μM, 10 μM o HNE 10 μM. En **b.** Se muestran magnificaciones de las zonas resaltadas (n= 5 células por condición, barra de calibración= 10 μm).

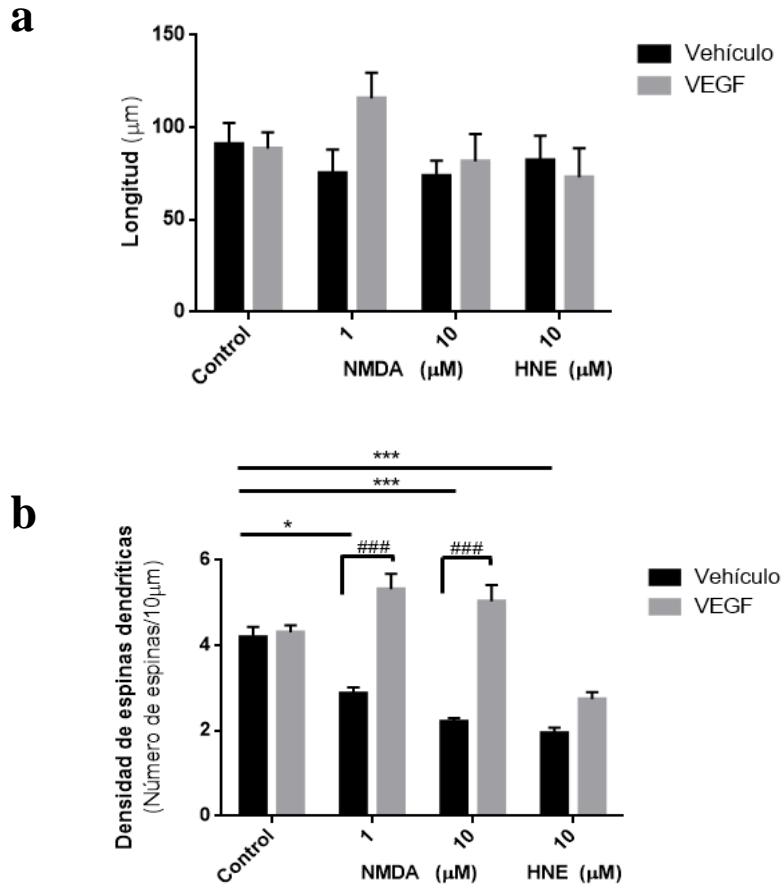


Figura 11. VEGF preserva la densidad de espinas dendríticas ante un estímulo excitotóxico subletal pero no frente al estrés oxidante. c. La longitud de las prolongaciones celulares no se ve afectada. **d.** La densidad de espinas dendríticas se ve reducida con NMDA o HNE, no así con el tratamiento de VEGF (n=5). Datos presentados como promedio \pm error estándar. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ comparado con el control, ### $P < 0.001$ comparado a la condición con vehículo.

Discusión

La heterogeneidad de los eventos degenerativos desencadenados por el infarto isquémico es uno de los principales desafíos en el tratamiento y desarrollo de terapias efectivas que eviten el daño ocasionado al parénquima cerebral. A pesar de que el daño en la zona de penumbra es considerado reversible, la progresión temporal de una serie de mecanismos bioquímicos perjudiciales agravan la lesión a expensas del tejido potencialmente rescatable y limitan la ventana terapéutica de los tratamientos actuales (Reeves et al., 2005). La severidad del daño a menudo depende de la magnitud de los diferentes componentes de la cascada isquémica por lo que la búsqueda de estrategias terapéuticas que intervengan en la progresión de más de uno de los procesos patogénicos resulta prometedora (George y Steinberg, 2015).

La fase aguda de la cascada isquémica comprende los primeros mecanismos de daño neuronal iniciados después de la caída de la perfusión sanguínea. La excitotoxicidad glutamatérgica ocurre desde los primeros minutos de isquemia y puede persistir hasta 6 horas después mientras que la generación de ROS ocurre en las horas subsecuentes, particularmente después de la restauración del flujo sanguíneo (Davalos et al., 1997; McCann et al., 2008). Aunque pueden actuar de manera sinérgica, estos mecanismos probablemente proceden de manera secuencial y convergen en la muerte neuronal. Con estas bases, el propósito de este estudio fue evaluar el efecto neuroprotector del VEGF ante los mecanismos degenerativos que componen la fase aguda de la cascada isquémica.

Señalización de VEGF en neuronas corticales *in vitro*

En el presente trabajo se encontró la presencia de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en el soma y neuritas de neuronas corticales DIV 7 además de demostrar que la administración de la isoforma VEGF₁₆₅ recombinante reduce la muerte neuronal ocasionada por la privación de factores tróficos y la excitotoxicidad. Estos resultados sugieren que las neuronas corticales son responsivas a VEGF y que éste es capaz de promover la supervivencia neuronal por un mecanismo que involucra la activación de los receptores VEGFR1 y 2.

A pesar de la baja actividad catalítica del receptor VEGFR1 la isoforma VEGF₁₆₅ presenta una mayor afinidad por éste receptor respecto al VEGFR2 (Waltenberger et al., 1994). La activación de VEGFR1 está asociada con la fosforilación de PI3K y la señalización a través de esta vía implicada en la supervivencia y migración celular en diferentes tipos celulares (Tchaikovski et al., 2008). Sin embargo, se ha reportado que la actividad de VEGFR1 no juega un papel preponderante en las neuronas pero sí en la de los astrocitos (Mani et al., 2005). Por su parte, se sabe que la señalización a través de VEGFR2 es responsable del efecto neuroprotector observado en modelos *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa y preconditionamiento isquémico *in vivo* (Lee et al., 2009; Wick et al., 2002). No obstante, el receptor 1 en las neuronas podría participar en la transactivación de VEGFR2 (Hiratsuka et al., 2005).

Es necesario indicar que VEGFR1 es blanco de HIF-1, mientras que VEGFR2 es sobreexpresado después de la hipoxia en una forma independiente de HIF-1 (Gerber et al., 1997), de modo que la proporción de ambos receptores puede ser regulada en respuesta al evento isquémico .

Efecto de VEGF sobre la excitotoxicidad ocasionada por NMDA

La excitotoxicidad es uno de los principales componentes de la fase aguda de la cascada isquémica y es ocasionada por la sobreactivación de los receptores ionotrópicos de glutamato, especialmente de los receptores de tipo NMDA. En este estudio la incubación con NMDA durante 24 h ocasionó la muerte de neuronas corticales en el DIV 11 de manera dosis dependiente además de la reducción de la densidad de espinas dendríticas en neuronas sometidas a dosis subletales de NMDA. En línea con este hallazgo se ha demostrado que la unión de NMDA a su receptor induce modificaciones morfológicas en las espinas dendríticas de neuronas del hipocampo mediante la activación del canal Panexina-1 independientemente del flujo de Ca^{2+} a través del receptor NMDA, lo que puede resultar en la reducción de tamaño o pérdida de espinas dendríticas (Stein et al., 2015; Weilinger et al., 2016).

La administración de VEGF a la par del tratamiento con NMDA evitó la muerte de las neuronas así como las alteraciones morfológicas asociadas al evento excitotóxico, de acuerdo con la hipótesis propuesta sobre el papel neuroprotector de dicho factor. Una explicación de este efecto puede plantearse a partir de lo observado por otros grupos que reportan neuroprotección contra la excitotoxicidad mediada por glutamato ejercida por VEGF a través de la activación de PI3K/Akt y un posterior incremento en la expresión de la proteína reguladora de la permeabilidad mitocondrial Bcl-2 en motoneuronas (Tolosa et al., 2008). En neuronas de hipocampo la administración de otra isoforma de VEGF produce la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos MEK 1/2 y impide la muerte excitotóxica (Beazley-Long et al., 2013), en ambos casos el receptor VEGFR2 es necesario para dicha protección .

Otro punto a considerar en la supervivencia de las neuronas es la regulación de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$. Se ha reportado que la estimulación con VEGF induce un flujo lento y sostenido de calcio a través de receptores NMDA así como la liberación de calcio de pozas intracelulares (Meissirel et al., 2011), este aumento citosólico de calcio puede extenderse al núcleo y tener un efecto transcripcional, particularmente a través del sistema de la calcio calmodulina proteína cinasa 2 (Fearnley et al., 2015; Kim et al., 2008). Un mecanismo similar ocurre en el caso de la neuroprotección ejercida por el factor neurotrófico derivado del cerebro que induce la señalización activada por calcio y promueve la formación y secreción de dímeros de inhibina β -A mismos que reducen la activación de los receptores NMDA y protegen la integridad de la mitocondria en neuronas de hipocampo (Lau et al., 2015).

Efecto de VEGF en el contexto de estrés oxidante, implicaciones para su efecto neuroprotector

Para esclarecer el papel que juega el VEGF frente al estrés oxidante los cultivos de neuronas corticales fueron expuestos a el HNE. Aunque se observó una tendencia a evitar la muerte ocasionada por HNE, VEGF no tuvo efecto neuroprotector significativo ante el estímulo oxidante. De igual manera, HNE provocó la pérdida de espinas dendríticas y éste efecto no fue rescatado por VEGF.

Estos resultados contrastan con el efecto observado en un modelo de estrés oxidante inducido por H_2O_2 en el que VEGF actúa como agente neuroprotector (Oosthuysen et al., 2001). Es importante considerar que H_2O_2 es una ROS cuya toxicidad depende en cierta medida a la activación de la vía p38, misma que puede ser inhibida por VEGF (Sanchez et al., 2010; Wang et al., 2003). Por el contrario, HNE es un producto estable de la

lipoperoxidación de alta reactividad. HNE altera la estructura de las neuritas por la formación de aductos proteicos con el citoesqueleto de β -actina, activa a la proteína supresora de tumores p53 y promueve la iniciación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Dalleau et al., 2013; Kokubo et al., 2008). Asimismo existen reportes de perturbaciones en la vía de señalización de VEGF causadas por la acumulación de HNE en otros tipos celulares (Garcia-Quintans et al., 2016; Vatsyayan et al., 2012), lo que proporciona otra explicación de la ausencia de protección observada en el modelo experimental empleado en este trabajo.

Dado que el estrés oxidante es un mecanismo propiciado por la sobrecarga de Ca^{2+} que tiene lugar durante el estímulo excitotóxico, a partir de estos resultados se propone que la forma en que VEGF evita la muerte neuronal durante la excitotoxicidad ocurre cascada arriba del daño mitocondrial y formación de ROS. Esto resulta relevante dado que VEGF ha demostrado ser efectivo frente a la excitotoxicidad en una ventana corta de tiempo en otros modelos experimentales (Tovar-y-Romo y Tapia, 2012).

VEGF y la muerte neuronal apoptótica inducida por estaurosporina

En este trabajo se reporta que la exposición a STS durante 24 h indujo la muerte de neuronas corticales de manera dosis dependiente y la administración de VEGF no evitó este efecto. La muerte de las neuronas expuestas a STS no depende de cambios en la homeostasis de Ca^{2+} sino que se ha atribuido principalmente a la inactivación de la proteína cinasa C y la consecuente liberación del citocromo c aunque se ha propuesto que la toxicidad de STS se debe a la convergencia de diferentes mecanismos que culminan con la activación de caspasas (Deshmukh y Johnson, 2000; Koh et al., 1995).

Aunque la administración de VEGF previa a la exposición a STS activa la vía de PI3K y evita la muerte de células ganglionares de la retina (Foxton et al., 2013), los resultados aquí presentados no muestran un efecto similar al exponer de manera conjunta a las neuronas corticales a STS y VEGF.

Conclusiones

El propósito de este trabajo fue evaluar el potencial neuroprotector de VEGF en cultivos primarios de neuronas corticales ante diferentes componentes de la fase aguda de la cascada isquémica. Se reporta la presencia de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 en neuronas corticales y la capacidad de éstas para responder ante la administración de VEGF recombinante. El VEGF evita la muerte excitotóxica y la degeneración de las espinas dendríticas ocasionada por NMDA pero no evita la muerte ocasionada por un estímulo oxidante o la exposición a STS, lo que puede explicar algunas de las limitaciones que tiene su potencial terapéutico. Sin embargo, dada la complejidad del evento isquémico estos resultados no implican que el VEGF ejerza otras funciones en diferentes blancos celulares *in vivo* o en las fases más avanzadas de la cascada isquémica.

Referencias

- Abid, M.R., Guo, S., Minami, T., Spokes, K.C., Ueki, K., Skurk, C., Walsh, K., y Aird, W.C. (2004). Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 294-300.
- Abramov, A.Y., y Duchen, M.R. (2008). Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochimica et biophysica acta* 1777, 953-964.
- Adini, A., Kornaga, T., Firoozbakht, F., y Benjamin, L.E. (2002). Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer research* 62, 2749-2752.
- Almeida, A., Moncada, S., y Bolanos, J.P. (2004). Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nature cell biology* 6, 45-51.
- Alle, H., Roth, A., y Geiger, J.R. (2009). Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 325, 1405-1408.
- Ankarcrona, M., Dygbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., y Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., *et al.* (2003). Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine* 9, 936-943.
- Ayala, A., Munoz, M.F., y Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, 360438.
- Bano, D., y Nicotera, P. (2007). Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 674-676.
- Beazley-Long, N., Hua, J., Jehle, T., Hulse, R.P., Dersch, R., Lehrling, C., Bevan, H., Qiu, Y., Lagreze, W.A., Wynick, D., *et al.* (2013). VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *The American journal of pathology* 183, 918-929.
- Benchoua, A., Guegan, C., Couriaud, C., Hosseini, H., Sampaio, N., Morin, D., y Onteniente, B. (2001). Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 7127-7134.
- Bender, E., y Kadenbach, B. (2000). The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS letters* 466, 130-134.
- Beretta, S., Cuccione, E., Versace, A., Carone, D., Riva, M., Padovano, G., Dell'Era, V., Cai, R., Monza, L., Presotto, L., *et al.* (2015). Cerebral collateral flow defines topography and evolution of molecular penumbra in experimental ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 74, 305-313.
- Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., y Smulson, M. (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 22932-22940.
- Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., y Cohen, G.M. (2001). Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *The EMBO journal* 20, 998-1009.
- Brennan, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., y Swanson, R.A.

- (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature neuroscience* 12, 857-863.
- Brouns, R., y De Deyn, P.P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 111, 483-495.
- Bruick, R.K., y McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Cao, G., Xiao, M., Sun, F., Xiao, X., Pei, W., Li, J., Graham, S.H., Simon, R.P., y Chen, J. (2004). Cloning of a novel Apaf-1-interacting protein: a potent suppressor of apoptosis and ischemic neuronal cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 6189-6201.
- Cao, L., Chen, J., Li, M., Qin, Y.Y., Sun, M., Sheng, R., Han, F., Wang, G., y Qin, Z.H. (2015). Endogenous level of TIGAR in brain is associated with vulnerability of neurons to ischemic injury. *Neuroscience bulletin* 31, 527-540.
- Cantú-Brito, C., Ruiz-Sandoval, J. L., Chiquete, E., Arauz, A., León-Jiménez, C., Murillo-Bonilla, L. M., Villareal-Careaga, J., Barinagarrementería, F., Fernández, J. A., Torres, B., Rodríguez-Leyva, I., Rangel-Guerra, R., RENAMEVASC. (2011). Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Rev Mex Neuroc* 12: 224-234.
- Chiquete, E., Ruiz-Sandoval, J. L., Murillo-Bonilla, L. M., Arauz, A., Villareal-Careaga, J., Barinagarrementería, F., Cantú-Brito, C. (2011). Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción. *Rev Mex Neuroci* 12, 235-241.
- Dalleau, S., Baradat, M., Gueraud, F., y Huc, L. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell death and differentiation* 20, 1615-1630.
- Davalos, A., Castillo, J., Serena, J., y Noya, M. (1997). Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 28, 708-710.
- Demchuk, A.M., Felburg, R.A., y Alexandrov, A.V. (1999). Clinical recovery from acute ischemic stroke after early reperfusion of the brain with intravenous thrombolysis. *The New England journal of medicine* 340, 894-895.
- Deshmukh, M., y Johnson, E.M., Jr. (2000). Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications. *Cell death and differentiation* 7, 250-261.
- Dohare, P., Hyzinski-Garcia, M.C., Vipani, A., Bowens, N.H., Nalwalk, J.W., Feustel, P.J., Keller, R.W., Jr., Jourdain, D., y Mongin, A.A. (2014). The neuroprotective properties of the superoxide dismutase mimetic tempol correlate with its ability to reduce pathological glutamate release in a rodent model of stroke. *Free radical biology & medicine* 77, 168-182.
- Dominguez, C., Delgado, P., Vilches, A., Martín-Gallan, P., Ribo, M., Santamarina, E., Molina, C., Corbeto, N., Rodríguez-Sureda, V., Rosell, A., *et al.* (2010). Oxidative stress after thrombolysis-induced reperfusion in human stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41, 653-660.
- Du, H., Li, P., Pan, Y., Li, W., Hou, J., Chen, H., Wang, J., y Tang, H. (2010). Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an in vitro ischemic model. *Brain research* 1357, 1-8.
- Duan, C.L., Liu, C.W., Shen, S.W., Yu, Z., Mo, J.L., Chen, X.H., y Sun, F.Y. (2015). Striatal astrocytes transdifferentiate into functional mature neurons following ischemic brain injury. *Glia* 63, 1660-1670.
- Egebjerg, J., Kukekov, V., y Heinemann, S.F. (1994). Intron sequence directs RNA editing of the glutamate receptor subunit GluR2 coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10270-10274.
- Eliasson, M.J., Huang, Z., Ferrante, R.J., Sasamata, M., Molliver, M.E., Snyder, S.H., y Moskowitz, M.A. (1999). Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *19*, 5910-5918.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* *35*, 495-516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., y Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43-50.
- Fagan, S.C., Waller, J.L., Nichols, F.T., Edwards, D.J., Pettigrew, L.C., Clark, W.M., Hall, C.E., Switzer, J.A., Ergul, A., y Hess, D.C. (2010). Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* *41*, 2283-2287.
- Fan, H., Li, X., Wang, W., Lai, Q., Tang, X., Gao, D., Yin, X., y Xu, T. (2015). Effects of NMDA-Receptor Antagonist on the Expressions of Bcl-2 and Bax in the Subventricular Zone of Neonatal Rats with Hypoxia-Ischemia Brain Damage. *Cell biochemistry and biophysics* *73*, 323-330.
- Fearnley, G.W., Bruns, A.F., Wheatcroft, S.B., y Ponnambalam, S. (2015). VEGF-A isoform-specific regulation of calcium ion flux, transcriptional activation and endothelial cell migration. *Biology open* *4*, 731-742.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., y Bolanos, J.P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *The Biochemical journal* *443*, 3-11.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., y LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* *9*, 669-676.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., y Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* *16*, 4604-4613.
- Foxton, R.H., Finkelstein, A., Vijay, S., Dahlmann-Noor, A., Khaw, P.T., Morgan, J.E., Shima, D.T., y Ng, Y.S. (2013). VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *The American journal of pathology* *182*, 1379-1390.
- Garcia-Quintans, N., Prieto, I., Sanchez-Ramos, C., Luque, A., Arza, E., Olmos, Y., y Monsalve, M. (2016). Regulation of endothelial dynamics by PGC-1alpha relies on ROS control of VEGF-A signaling. *Free radical biology & medicine* *93*, 41-51.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Trumbekaite, S., Korzeniewski, B., Gaynutdinov, T., Seppet, E., Vielhaber, S., Heinze, H.J., y Striggow, F. (2012). Cytosolic Ca²⁺ regulates the energization of isolated brain mitochondria by formation of pyruvate through the malate-aspartate shuttle. *The Biochemical journal* *443*, 747-755.
- George, P.M., y Steinberg, G.K. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron* *87*, 297-309.
- Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J., y Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* *272*, 23659-23667.
- Gorter, J.A., Petrozzino, J.J., Aronica, E.M., Rosenbaum, D.M., Opitz, T., Bennett, M.V., Connor, J.A., y Zukin, R.S. (1997). Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *17*, 6179-6188.
- Grau, A.J., Weimar, C., Buggle, F., Heinrich, A., Goertler, M., Neumaier, S., Glahn, J., Brandt, T., Hacke, W., y Diener, H.C. (2001). Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke; a journal of cerebral circulation* *32*, 2559-2566.
- Greger, I.H., Ziff, E.B., y Penn, A.C. (2007). Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends in neurosciences* *30*, 407-416.
- Guadagno, J., Xu, X., Karajgikar, M., Brown, A., y Cregan, S.P. (2013). Microglia-

- derived TNF α induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. *Cell death & disease* 4, e538.
- Hartings, J.A., Rolli, M.L., Lu, X.C., y Tortella, F.C. (2003). Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11602-11610.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernandez, E., Maestre, C., Moncada, S., y Bolanos, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* 11, 747-752.
- Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y., y Shibuya, M. (2005). Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Molecular and cellular biology* 25, 346-354.
- Hotzy, J., Schneider, N., Kovermann, P., y Fahlke, C. (2013). Mutating a conserved proline residue within the trimerization domain modifies Na⁺ binding to excitatory amino acid transporters and associated conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 288, 36492-36501.
- Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., y Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular endocrinology* 5, 1806-1814.
- Huttemann, M., Lee, I., Grossman, L.I., Doan, J.W., y Sanderson, T.H. (2012). Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Advances in experimental medicine and biology* 748, 237-264.
- Ikemune, K., Mitani, A., Namba, S., Kataoka, K., y Arai, T. (1999). Functional changes of N-methyl-D-aspartic acid and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate channels in gerbil hippocampal CA1, in relation to postischemic enhancement of glutamate receptor-mediated responses. *Neuroscience letters* 275, 125-128.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2015). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Consultado Septiembre 2016. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulado/s/ConsultaMortalidad.asp>
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M.J., Kaufman, E., y Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4879-4884.
- Jauch, E.C., Saver, J.L., Adams, H.P., Jr., Bruno, A., Connors, J.J., Demaerschalk, B.M., Khatri, P., McMullan, P.W., Jr., Qureshi, A.I., Rosenfield, K., *et al.* (2013). Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 44, 870-947.
- Jiang, S., Xia, R., Jiang, Y., Wang, L., y Gao, F. (2014). Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier. *PloS one* 9, e86407.
- Jin, K.L., Mao, X.O., y Greenberg, D.A. (2000a). Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10242-10247.
- Jin, K.L., Mao, X.O., Nagayama, T., Goldsmith, P.C., y Greenberg, D.A. (2000b). Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 100, 713-717.
- Johnston, M.V., Fatemi, A., Wilson, M.A., y Northington, F. (2011). Treatment

- advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *The Lancet Neurology* 10, 372-382.
- Jung, J.E., Kim, G.S., Chen, H., Maier, C.M., Narasimhan, P., Song, Y.S., Niizuma, K., Katsu, M., Okami, N., Yoshioka, H., *et al.* (2010). Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Molecular neurobiology* 41, 172-179.
- Kearney, J.B., Kappas, N.C., Ellerstrom, C., DiPaola, F.W., y Bautch, V.L. (2004). The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 103, 4527-4535.
- Kim, B.W., Choi, M., Kim, Y.S., Park, H., Lee, H.R., Yun, C.O., Kim, E.J., Choi, J.S., Kim, S., Rhim, H., *et al.* (2008). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cellular signalling* 20, 714-725.
- Kintner, D.B., Chen, X., Currie, J., Chanana, V., Ferrazzano, P., Baba, A., Matsuda, T., Cohen, M., Orłowski, J., Chiu, S.Y., *et al.* (2010). Excessive Na⁺/H⁺ exchange in disruption of dendritic Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial dysfunction following in vitro ischemia. *The Journal of biological chemistry* 285, 35155-35168.
- Koh, J.Y., Wie, M.B., Gwag, B.J., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Demaro, J., Csernansky, C., y Choi, D.W. (1995). Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Experimental neurology* 135, 153-159.
- Kokubo, J., Nagatani, N., Hiroki, K., Kuroiwa, K., Watanabe, N., y Arai, T. (2008). Mechanism of destruction of microtubule structures by 4-hydroxy-2-nonenal. *Cell structure and function* 33, 51-59.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kothe, K., Kwiatkowski, D.J., *et al.* (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Kulik, A., Trapp, S., y Ballanyi, K. (2000). Ischemia but not anoxia evokes vesicular and Ca(2+)-independent glutamate release in the dorsal vagal complex in vitro. *Journal of neurophysiology* 83, 2905-2915.
- Lang-Rollin, I.C., Rideout, H.J., Noticewala, M., y Stefanis, L. (2003). Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11015-11025.
- Lau, D., Bengtson, C.P., Buchthal, B., y Bading, H. (2015). BDNF Reduces Toxic Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling via Synaptic NMDA Receptors and Nuclear-Calcium-Induced Transcription of *inhba/Activin A*. *Cell reports* 12, 1353-1366.
- Lee, H.T., Chang, Y.C., Tu, Y.F., y Huang, C.C. (2009). VEGF-A/VEGFR-2 signaling leading to cAMP response element-binding protein phosphorylation is a shared pathway underlying the protective effect of preconditioning on neurons and endothelial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 4356-4368.
- Li, S., Nie, E.H., Yin, Y., Benowitz, L.I., Tung, S., Vinters, H.V., Bahjat, F.R., Stenzel-Poore, M.P., Kawaguchi, R., Coppola, G., *et al.* (2015). GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke. *Nature neuroscience* 18, 1737-1745.
- Lu, C., Chan, S.L., Fu, W., y Mattson, M.P. (2002). The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal facilitates opening of voltage-dependent Ca²⁺ channels in neurons by increasing protein tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 277, 24368-24375.
- Lu, C., Chan, S.L., Haughey, N., Lee, W.T., y Mattson, M.P. (2001). Selective and biphasic effect of the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal on N-methyl-D-aspartate channels. *Journal of neurochemistry* 78, 577-589.
- Lyden, P., Shuaib, A., Ng, K., Levin, K., Atkinson, R.P., Rajput, A., Wechsler, L., Ashwood, T., Claesson, L., Odergren, T., *et*

- al.* (2002). Clomethiazole Acute Stroke Study in ischemic stroke (CLASS-I): final results. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 33, 122-128.
- Machler, P., Wyss, M.T., Elsayed, M., Stobart, J., Gutierrez, R., von Faber-Castell, A., Kaelin, V., Zuend, M., San Martin, A., Romero-Gomez, I., *et al.* (2016). In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell metabolism* 23, 94-102.
- Manhas, N., Shi, Y., Taunton, J., y Sun, D. (2010). p90 activation contributes to cerebral ischemic damage via phosphorylation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Journal of neurochemistry* 114, 1476-1486.
- Mani, N., Khaibullina, A., Krum, J.M., y Rosenstein, J.M. (2005). Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Experimental neurology* 192, 394-406.
- Marcy, V.R., y Welsh, F.A. (1984). Correlation between cerebral blood flow and ATP content following tourniquet-induced ischemia in cat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 4, 362-367.
- Margaritescu, O., Pirici, D., y Margaritescu, C. (2011). VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 52, 1283-1292.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., y Portera-Cailliau, C. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain research bulletin* 46, 281-309.
- Maurer, G.D., Brucker, D.P., Bahr, O., Harter, P.N., Hattungen, E., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Steinbach, J.P., y Rieger, J. (2011). Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC cancer* 11, 315.
- McCann, S.K., Dusting, G.J., y Roulston, C.L. (2008). Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats. *Journal of neuroscience research* 86, 2524-2534.
- McKenna, M.C. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *Journal of neuroscience research* 85, 3347-3358.
- McTigue, M.A., Wickersham, J.A., Pinko, C., Showalter, R.E., Parast, C.V., Tempczyk-Russell, A., Gehring, M.R., Mroczkowski, B., Kan, C.C., Villafranca, J.E., *et al.* (1999). Crystal structure of the kinase domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2: a key enzyme in angiogenesis. *Structure* 7, 319-330.
- Meissirel, C., Ruiz de Almodovar, C., Knevels, E., Coulon, C., Chounlamountri, N., Segura, I., de Rossi, P., Vinckier, S., Anthonis, K., Deleglise, B., *et al.* (2011). VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13782-13787.
- Miller, A.A., Dusting, G.J., Roulston, C.L., y Sobey, C.G. (2006). NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. *Brain research* 1111, 111-116.
- Muller, M., y Somjen, G.G. (2000). Na⁽⁺⁾ dependence and the role of glutamate receptors and Na⁽⁺⁾ channels in ion fluxes during hypoxia of rat hippocampal slices. *Journal of neurophysiology* 84, 1869-1880.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.
- Neely, M.D., Boutte, A., Milatovic, D., y Montine, T.J. (2005). Mechanisms of 4-hydroxynonenal-induced neuronal microtubule dysfunction. *Brain research* 1037, 90-98.
- Ning, K., Pei, L., Liao, M., Liu, B., Zhang, Y., Jiang, W., Mielke, J.G., Li, L., Chen, Y., El-Hayek, Y.H., *et al.* (2004). Dual

- neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 4052-4060.
- Nishi, T., Maier, C.M., Hayashi, T., Saito, A., y Chan, P.H. (2005). Superoxide dismutase 1 overexpression reduces MCP-1 and MIP-1 alpha expression after transient focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 1312-1324.
- Niswender, C.M., y Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 295-322.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. Ginebra, OMS.
- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., *et al.* (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature genetics* 28, 131-138.
- Palmer, C., Brucklacher, R.M., Christensen, M.A., y Vannucci, R.C. (1990). Carbohydrate and energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 10, 227-235.
- Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R.K., Peale, F., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Koch, A.W., y Watts, R.J. (2007). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *The Journal of biological chemistry* 282, 24049-24056.
- Park, J.E., Keller, G.A., y Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular biology of the cell* 4, 1317-1326.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., y Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature reviews Neuroscience* 13, 22-37.
- Powers, W.J., Derdeyn, C.P., Biller, J., Coffey, C.S., Hoh, B.L., Jauch, E.C., Johnston, K.C., Johnston, S.C., Khalessi, A.A., Kidwell, C.S., *et al.* (2015). 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 46, 3020-3035.
- Racay, P., Tatarkova, Z., Chomova, M., Hatok, J., Kaplan, P., y Dobrota, D. (2009). Mitochondrial calcium transport and mitochondrial dysfunction after global brain ischemia in rat hippocampus. *Neurochemical research* 34, 1469-1478.
- Rahimi, N. (2006). VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11, 818-829.
- Rameau, G.A., Chiu, L.Y., y Ziff, E.B. (2004). Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry* 279, 14307-14314.
- Rami, A., Sims, J., Botez, G., y Winckler, J. (2003). Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia. *Neurochemistry international* 43, 79-87.
- Reeves, M.J., Arora, S., Broderick, J.P., Frankel, M., Heinrich, J.P., Hickenbottom, S., Karp, H., LaBresh, K.A., Malarcher, A., Mensah, G., *et al.* (2005). Acute stroke care in the US: results from 4 pilot prototypes of the Paul Coverdell National Acute Stroke

- Registry. Stroke; a journal of cerebral circulation 36, 1232-1240.
- Rivera Nava, S. C., Miranda Medrano, L. I., Flores, J. D., Pérez Rojas, A., Torres Arreola, L. D., Argüero y Reyes, L., . . . Hernández Santillán, D. L. 2008. GPC: Prevención secundaria, diagnóstico, tratamiento y vigilancia de la enfermedad vascular cerebral isquémica. México: Secretaria de Salud.
- Rossi, D.J., Oshima, T., y Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316-321.
- Sacco, R.L., Benjamin, E.J., Broderick, J.P., Dyken, M., Easton, J.D., Feinberg, W.M., Goldstein, L.B., Gorelick, P.B., Howard, G., Kittner, S.J., *et al.* (1997). American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 28, 1507-1517.
- Sairanen, T., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Paetau, A., Ijas, P., y Lindsberg, P.J. (2006). Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke-a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain : a journal of neurology* 129, 189-199.
- Sakahira, H., Enari, M., y Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sanchez, A., Wadhvani, S., y Grammas, P. (2010). Multiple neurotrophic effects of VEGF on cultured neurons. *Neuropeptides* 44, 323-331.
- Sattler, R., Charlton, M.P., Hafner, M., y Tymianski, M. (1998). Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* 71, 2349-2364.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., y Tymianski, M. (1999). Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284, 1845-1848.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., y Tymianski, M. (2000). Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 22-33.
- Saver, J.L., Starkman, S., Eckstein, M., Stratton, S.J., Pratt, F.D., Hamilton, S., Conwit, R., Liebeskind, D.S., Sung, G., Kramer, I., *et al.* (2015). Prehospital use of magnesium sulfate as neuroprotection in acute stroke. *The New England journal of medicine* 372, 528-536.
- Schafer, M.K., Pfeiffer, A., Jaeckel, M., Pouya, A., Dolga, A.M., y Methner, A. (2014). Regulators of mitochondrial Ca(2+) homeostasis in cerebral ischemia. *Cell and tissue research* 357, 395-405.
- Schaur, R.J. (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular aspects of medicine* 24, 149-159.
- Schonfeld, P., y Reiser, G. (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33, 1493-1499.
- Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., y McKenna, M.C. (2014). Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Advances in neurobiology* 11, 13-30.
- Schwamm, L.H., Koroshetz, W.J., Sorensen, A.G., Wang, B., Copen, W.A., Budzik, R., Rordorf, G., Buonanno, F.S., Schaefer, P.W., y Gonzalez, R.G. (1998). Time course of lesion development in patients with acute stroke: serial diffusion- and hemodynamic-weighted magnetic resonance imaging. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 29, 2268-2276.
- Shen, C.C., Yang, Y.C., Chiao, M.T., Cheng, W.Y., Tsuei, Y.S., y Ko, J.L. (2010). Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke. *Current neurovascular research* 7, 6-14.
- Shen, S.W., Duan, C.L., Chen, X.H., Wang, Y.Q., Sun, X., Zhang, Q.W., Cui, H.R., y Sun, F.Y. (2016). Neurogenic effect of VEGF is related to increase of astrocytes

- transdifferentiation into new mature neurons in rat brains after stroke. *Neuropharmacology* 108, 451-461.
- Sheth, S.A., Jahan, R., Gralla, J., Pereira, V.M., Nogueira, R.G., Levy, E.I., Zaidat, O.O., Saver, J.L., y Trialists, S.-S. (2015). Time to endovascular reperfusion and degree of disability in acute stroke. *Annals of neurology* 78, 584-593.
- Singh, A.J., Meyer, R.D., Band, H., y Rahimi, N. (2005). The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation. *Molecular biology of the cell* 16, 2106-2118.
- Slee, E.A., Adrain, C., y Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 7320-7326.
- Sorce, S., Schiavone, S., Tucci, P., Colaianna, M., Jaquet, V., Cuomo, V., Dubois-Dauphin, M., Trabace, L., y Krause, K.H. (2010). The NADPH oxidase NOX2 controls glutamate release: a novel mechanism involved in psychosis-like ketamine responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 11317-11325.
- Stanika, R.I., Pivovarova, N.B., Brantner, C.A., Watts, C.A., Winters, C.A., y Andrews, S.B. (2009). Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9854-9859.
- Stanika, R.I., Villanueva, I., Kazanina, G., Andrews, S.B., y Pivovarova, N.B. (2012). Comparative impact of voltage-gated calcium channels and NMDA receptors on mitochondria-mediated neuronal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 6642-6650.
- Stein, I.S., Gray, J.A., y Zito, K. (2015). Non-Ionotropic NMDA Receptor Signaling Drives Activity-Induced Dendritic Spine Shrinkage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 12303-12308.
- Storkebaum, E., y Carmeliet, P. (2004). VEGF: a critical player in neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* 113, 14-18.
- Sun, M., Zhao, Y., Gu, Y., y Xu, C. (2009). Inhibition of nNOS reduces ischemic cell death through down-regulating calpain and caspase-3 after experimental stroke. *Neurochemistry international* 54, 339-346.
- Switzer, J.A., Hess, D.C., Ergul, A., Waller, J.L., Machado, L.S., Portik-Dobos, V., Pettigrew, L.C., Clark, W.M., y Fagan, S.C. (2011). Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42, 2633-2635.
- Taimel, Z., Loughran, J., Birks, E.J., y Bolli, R. 2013. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nature Reviews Cardiology* 10, 519-530.
- Tanaka, E., Yamamoto, S., Kudo, Y., Mihara, S., y Higashi, H. (1997). Mechanisms underlying the rapid depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* 78, 891-902.
- Tchaikovski, V., Fellbrich, G., y Waltenberger, J. (2008). The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 322-328.
- Tekkok, S.B., y Goldberg, M.P. (2001). Ampa/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 4237-4248.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., y Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry* 266, 11947-11954.
- Tolosa, L., Mir, M., Asensio, V.J., Olmos, G., y Llado, J. (2008). Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced

- excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of neurochemistry* 105, 1080-1090.
- Tovar-y-Romo, L.B., Penagos-Puig, A., y Ramirez-Jarquín, J.O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of neurochemistry* 136, 13-27.
- Tovar-y-Romo, L.B., y Tapia, R. (2012). Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN neuro* 4.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., y Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62, 405-496.
- Tu, W., Xu, X., Peng, L., Zhong, X., Zhang, W., Soundarapandian, M.M., Balel, C., Wang, M., Jia, N., Zhang, W., *et al.* (2010). DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140, 222-234.
- Uzun, G., Subhani, D., y Amor, S. (2010). Trophic factors and stem cells for promoting recovery in stroke. *Journal of vascular and interventional neurology* 3, 3-12.
- van Hall, G., Stromstad, M., Rasmussen, P., Jans, O., Zaar, M., Gam, C., Quistorff, B., Secher, N.H., y Nielsen, H.B. (2009). Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1121-1129.
- Vatsyayan, R., Lelsani, P.C., Chaudhary, P., Kumar, S., Awasthi, S., y Awasthi, Y.C. (2012). The expression and function of vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelial (RPE) cells is regulated by 4-hydroxynonenal (HNE) and glutathione S-transferaseA4-4. *Biochemical and biophysical research communications* 417, 346-351.
- Wakatsuki, S., Furuno, A., Ohshima, M., y Araki, T. (2015). Oxidative stress-dependent phosphorylation activates ZNRF1 to induce neuronal/axonal degeneration. *The Journal of cell biology* 211, 881-896.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., y Heldin, C.H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 269, 26988-26995.
- Wang, J.Y., Shum, A.Y., Ho, Y.J., y Wang, J.Y. (2003). Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H₂O₂ and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *Journal of neuroscience research* 72, 508-519.
- Wang, Y., Kilic, E., Kilic, U., Weber, B., Bassetti, C.L., Marti, H.H., y Hermann, D.M. (2005). VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain : a journal of neurology* 128, 52-63.
- Wardlaw, J.M., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R.L., y Cohen, G. (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379, 2364-2372.
- Weidemann, A., y Johnson, R.S. (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell death and differentiation* 15, 621-627.
- Weilinger, N.L., Lohman, A.W., Rakai, B.D., Ma, E.M., Bialecki, J., Maslieieva, V., Rilea, T., Bandet, M.V., Ikuta, N.T., Scott, L., *et al.* (2016). Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity. *Nature neuroscience* 19, 432-442.
- Wick, A., Wick, W., Waltenberger, J., Weller, M., Dichgans, J., y Schulz, J.B. (2002). Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 6401-6407.

- Xiong, Y., Huo, Y., Chen, C., Zeng, H., Lu, X., Wei, C., Ruan, C., Zhang, X., Hu, Z., Shibuya, M., *et al.* (2009). Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 284, 23217-23224.
- Yamashima, T., Tonchev, A.B., Tsukada, T., Saido, T.C., Imajoh-Ohmi, S., Momoi, T., y Kominami, E. (2003). Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13, 791-800.
- Yang, G.Y., Chen, S.F., Kinouchi, H., Chan, P.H., y Weinstein, P.R. (1992). Edema, cation content, and ATPase activity after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 23, 1331-1336.
- Yoshino, H., Hattori, N., Urabe, T., Uchida, K., Tanaka, M., y Mizuno, Y. (1997). Postischemic accumulation of lipid peroxidation products in the rat brain: immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins. *Brain research* 767, 81-86.
- Zarkovic, K. (2003). 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of medicine* 24, 293-303.
- Zhou, C., Li, C., Yu, H.M., Zhang, F., Han, D., y Zhang, G.Y. (2008). Neuroprotection of gamma-aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research* 86, 2973-2983.
- Zhou, L., Li, F., Xu, H.B., Luo, C.X., Wu, H.Y., Zhu, M.M., Lu, W., Ji, X., Zhou, Q.G., y Zhu, D.Y. (2010). Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nature medicine* 16, 1439-1443.
- Zhou, X., Ding, Q., Chen, Z., Yun, H., y Wang, H. (2013). Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 288, 24151-24159.